

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE CANOLA EM GRÃO NA
DIETA DE NOVILHAS DA RAÇA HOLANDÊS E SUA
INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Autora: Danieli Aparecida Bóbbio Moreski
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. Fabio Luiz Bim Cavalieri

Maringá - PR
fevereiro – 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE CANOLA EM GRÃO NA
DIETA DE NOVILHAS DA RAÇA HOLANDÊS E SUA
INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Autora: Danieli Aparecida Bóbbo Moreski
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. Fabio Luiz Bim Cavalieri

Tese apresentada como parte das exigências
para obtenção do título de DOUTORA EM
ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia da Universidade Estadual de
Maringá – Área de concentração Produção
Animal

Maringá - PR
fevereiro – 2024

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

M843e

Moreski, Danieli Aparecida Bóbbo

Efeito da utilização de canola em grão na dieta de novilhas da raça holandês e sua influência na produção *in vitro* de embriões / Danieli Aparecida Bóbbo Moreski. -- Maringá, PR, 2024.

109 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos.

Coorientador: Prof. Dr. Fabio Luiz Bim Cavalieri.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2024.

1. Produção *in vitro* de embriões (PIVE). 2. Ácidos graxos poli-insaturados. 3. Novilhas da raça holandesa. 4. Canola. 5. Novilhas leiteiras. I. Santos, Geraldo Tadeu dos , orient. II. Cavalieri, Fabio Luiz Bim , coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 636.08245

Marinalva Aparecida Spolon Almeida - 9/1094



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE CANOLA EM GRÃO
NA DIETA DE NOVILHAS DA RAÇA HOLANDÊS
E SUA INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO *IN VITRO*
DE EMBRIÕES

Autora: Danieli Aparecida Bóbbo Moreski
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 29 de fevereiro de 2024.

Profª Drª Francilaine Eloise De
Marchi

Prof. Dr. Fabio Morotti

Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves

Profª Drª Elizângela Mirian
Moreira

Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos
Orientador

“Uma mente que tenha sido estirada por novas ideias nunca poderá recobrar sua forma original”.

Albert Einstein.

Dedico este trabalho a Deus que é a base da minha vida. Dedico, em especial, ao meu pai Carlos Bóbbo Neto (*in memoriam*), pelo orgulho que ele sentia de ter uma filha cursando doutorado, sem saber direito o que era.

Dedico à minha amiga Thainara (*in memoriam*), pelo apoio que me dava.

Dedico à minha filha Samantha e ao meu esposo Humberto, pelo apoio dado nos momentos difíceis.

Dedico ao Professor Doutor Fabio Luiz Bim Cavaliere, por acreditar no meu potencial e por sempre caminhar comigo, trabalhando arduamente para que este trabalho concluísse.

Dedico ao meu Orientador Doutor Geraldo Tadeu dos Santos, por me aceitar como sua Orientada, e a todos que de alguma forma contribuíram para realizar este sonho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser essencial na minha vida, autor do meu destino e socorro presente nas horas difíceis.

À Universidade Estadual de Maringá, por ter possibilitado desenvolver este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e a todos os seus professores, pela oportunidade e ensinamentos proporcionados.

Ao Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, pela orientação e toda ajuda dada durante o período do doutorado.

Ao Prof. Dr. Fábio Luiz Bim Cavaliere, pela paciência, disponibilidade e ajuda dada nesta etapa da minha vida e, principalmente, pela consideração ao longo desta caminhada.

Ao CNPq, Projeto produtividade em Pesquisa, Proc. 306.964/2021-0 e Projeto Universal, Proc. 403.555/2021-3.

A todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram, a minha gratidão.

BIOGRAFIA

DANIELI APARECIDA BÓBBO MORESKI, filha de Carlos Bóbbo Neto e Marilene Aparecida Custódio Bóbbo. Nasceu na cidade Itambé, no estado do Paraná, no dia 25 de maio de 1986.

Cursou graduação em Ciência Biológicas na Faculdade de Jandaia do Sul, na cidade de Jandaia do Sul, no período de 2008 a 2011.

Cursou especialização em Anatomia e Histologia, Método de Ensino e Pesquisa, área de concentração: Morfologia, na Universidade Estadual de Maringá, em 2013 defendeu o trabalho intitulado “ Ação Cicatrizante de plantas medicinais: um estudo de revisão”, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a. Eneri Vieira de Souza Leite Mello.

Em 28 de fevereiro de 2019, obteve o título de Mestra em Tecnologias Limpas pelo programa de pós-graduação em Tecnologias Limpas da UniCesumar, área de concentração Tecnologias Limpas (Agroindústria e agropecuária sustentável), com a dissertação intitulada “Geração de Embriões Bovinos *in vitro* Criotolerantes para Incrementar a Sustentabilidade da Cadeia Produtiva”, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a. Isabele Picada Emanuelli.

Em 2020 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.

Em 30 de agosto de 2022 submeteu-se ao exame de qualificação como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Zootecnia.

Em fevereiro de 2024, submeteu-se à banca para defesa da tese de doutorado.

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| LISTA DE TABELAS | ix |
| LISTA DE FIGURAS | xi |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xii |
| RESUMO | xv |
| ABSTRACT | xvii |
| I - INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Introdução geral | 1 |
| 1.2 Metabolismo lipídico de ruminantes | 3 |
| 1.3 Biohidrogenação e absorção dos lipídios | 3 |
| 1.4 Novilhas leiteiras na reprodução | 5 |
| 1.5 Canola | 7 |
| 1.6 Grão de canola inteiro no desempenho reprodutivo | 8 |
| 1.7 Ácidos graxos na reprodução de fêmeas bovinas | 10 |
| 1.8 Ácidos graxos na nutrição de vacas leiteiras | 18 |
| 1.9 Fisiologia reprodutiva da fêmea bovina | 19 |
| 1.10 Função lipídica nas fases do ciclo estral | 21 |
| 1.10.1 Fase do recrutamento | 22 |
| 1.10.2 Fase da divergência | 22 |

| | |
|--|----|
| 1.10.3 Fase da dominância | 23 |
| 1.11 Ovum <i>pick-up</i> - opu | 24 |
| 1.12 Sincronização da onda folicular | 24 |
| 1.13 Ácidos graxos na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos (PIVE)..... | 25 |
| Referências..... | 30 |
| II - OBJETIVOS GERAIS..... | 46 |
| 2.1 Objetivos específicos..... | 46 |
| Artigo III - Uso de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês altera a quantidade e o perfil de ácidos graxos na circulação e no líquido folicular | 47 |
| RESUMO | 47 |
| ABSTRACT..... | 47 |
| 1. Introdução | 48 |
| 2. Materiais e métodos | 49 |
| 2.1 Declaração De Ética | 49 |
| 2.2 Local e Instalações | 49 |
| 2.3 Animais e Dietas | 50 |
| 2.4 Coleta de Sangue | 52 |
| 2.5 Coleta do Líquido Folicular | 53 |
| 2.6 Esterificação Direta de AGs em Sangue e Líquido Folicular | 54 |
| 2.7 Identificação dos AGs por Cromatografia em fase Gasosa Acoplada À Espectrometria de Massa (GC-MS) | 54 |
| 2.8 Quantificação Dos AGs por Cromatografia em Fase Gasosa Com Detector De Ionização De Chama (GC/FID) | 54 |
| 2.9 Análises estatísticas..... | 55 |
| 3. Resultados | 55 |
| 4. Discussão | 61 |
| 5. Conclusão | 63 |
| Referências | 63 |
| Artigo IV – Avaliação do número de oócitos em novilhas doadoras da raça Holandês a partir da inclusão de grão de canola na dieta | 68 |

| | |
|---|-----------|
| RESUMO..... | 68 |
| ABSTRACT..... | 69 |
| 1. Introdução..... | 70 |
| 2. Materiais e métodos | 71 |
| 2.1 Declaração de ética..... | 71 |
| 2.2 Local e instalações | 71 |
| 2.3 Animais e dietas..... | 71 |
| 2.4 Delineamento experimental..... | 74 |
| 2.5 Aspiração folicular - OPU | 76 |
| 2.6 Produção in vitro de embriões | 77 |
| 2.7 Caracterização das estruturas ovarianas e parâmetros bioquímicos..... | 78 |
| 2.8 Análises estatísticas..... | 78 |
| 3. Resultados | 79 |
| 4. Discussão | 83 |
| 5. Conclusão..... | 85 |
| Referências..... | 85 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| Artigo III - Uso de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês altera a quantidade e o perfil de ácidos graxos na circulação e no líquido folicular | |
| Tabela 1- Composição (kg/MS) das dietas experimentais..... | 50 |
| Tabela 2. Composição de ácidos graxos das dietas experimentais, T1 = Controle e T2= Canola (%)...... | 52 |
| Tabela 3. Efeito da inclusão de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês na ingestão diária de matéria seca (IMS), proteína bruta (IPB), extrato etéreo (IEE) e fibra em detergente neutro (IFDN)..... | 56 |
| Tabela 4. Ácidos graxos identificados por CG/MS (esterificação direta) em <i>pool</i> de amostras de líquido folicular (LF) e de plasma de novilhas da raça Holandês alimentadas com dieta com e sem canola em grão..... | 57 |
| Tabela 5. Média da quantificação por CG/FID de ácidos graxos (esterificação direta) em amostras de plasma de novilhas alimentadas com dieta com e sem canola em grão, de acordo com a coleta de sangue ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)..... | 58 |
| Tabela 6. Média da quantificação por CG/FID de ácidos graxos (esterificação direta) em <i>pool</i> de amostras de líquido folicular de novilhas da raça Holandês, alimentadas com dieta com e sem canola em grão ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) | 59 |

Tabela 7. Média da quantificação por CG/FID (esterificação direta) de ácidos graxos totais (AGT), saturados (AGS), insaturados (AGI), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) e porcentagem em pool de amostras de líquido folicular e amostras de plasma de vacas da raça Holandês, alimentadas com dieta com e sem canola em grão.....60

Artigo IV - Avaliação do número de oócitos em novilhas doadoras da raça Holandês a partir da inclusão de grão de canola na dieta

Tabela 1- Composição (kg/MS) das dietas experimentais.....72

Tabela 2. Composição de ácidos graxos das dietas experimentais (%)74

Tabela 3. Eficiência da *ovum pick-up* (OPU) e da produção *in vitro* de embriões de novilhas Holandês alimentadas sem canola em grão (T1) e com canola em grão (T2)80

Tabela 4. Efeito da inclusão de Canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês no número de folículos totais, tamanho do folículo dominante e tamanho do corpo lúteo...82

Tabela 5. Efeito da inclusão de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês e seu efeito nas concentrações sanguíneas de alguns metabólitos sanguíneos83

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Desenvolvimento folicular com duas ondas de crescimento..... | 21 |
| Artigo III - Uso de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês altera a quantidade e o perfil de ácidos graxos na circulação e no líquido folicular | |
| Figura 1. Esquema experimental..... | 53 |
| Artigo IV - Avaliação do número de oócitos em novilhas doadoras da raça Holandês a partir da inclusão de grão de canola na dieta | |
| Figura 1. Esquema experimental..... | 75 |
| Figura 2. Efeito da inclusão de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês no número oócitos totais aspirados..... | 81 |
| Figura 3. Efeito da inclusão de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês no número de oócitos viáveis aspirados..... | 82 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AG - Ácido graxo

AGNE – Ácidos graxos não esterificados

AGI – Ácido graxo insaturado

AGMI – Ácidos graxos monoinsaturados

AGPI - Ácidos graxos poli-insaturados

AGS – Ácidos graxos saturados

ALA – Ácido alfa-linolênico

ATP – Adenosina trifosfato

BH - Biohidrogenação

CIV – Cultivo *in vitro*

CL – Corpo lúteo

COCs – Complexo *cumulus*-oócito

D – Dia

DG – Diacilglicerol

DHA – Docosahexaenoico

DTM – Dieta total misturada

E2 - Estradiol

ECC – Escore de condição corporal

EE – Extrato etéreo

EPA – Eicosapentaenoico

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FDN – Fibra em detergente neutro

FIV– Fertilização *in vitro*

FSH – Hormônio folículo estimulante

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IA - Inseminação artificial

IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo

IGF-I – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IN - Instrução Normativa

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LH – Hormônio luteinizante

MG - Monoacilglicerol

MIV– Maturação *in vitro*

MS – Matéria seca

NDT – Nutrientes digestíveis totais

OPU – Ovum pick-up / Punção folicular guiada por ultrassom

PB – Proteína bruta

P4 – Progesterona

PGs - Prostaglandinas

PGF2 α – Prostaglandina F2 α

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

PL - Fosfolipídios

SFB – Soro fetal bovino

SOF - Synthetic Oviduct Fluid

TAG - Triacilglicerol

TE – Transferência de embrião

US - Ultrassonografia

VLDL – Lipoproteína de densidade muito baixa

ω -3 - Ômega -3

ω -6 - Ômega- 6

ω -9 – Ômega-9

ZP - Zona pelúcida

RESUMO

O aumento da produtividade das vacas de leite de maneira sustentável é um grande desafio. Fisiologicamente ao aumentar a produção de leite aumenta a demanda energética, podendo dificultar a reprodução. A reprodução é diretamente influenciada pela produção de leite e nutrição. Diante disso, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês, na quantidade e qualidade do oócito, produção *in vitro* de embriões (PIVE) e nas concentrações sanguíneas e foliculares de diferentes ácidos graxos. O estudo foi conduzido na Fazenda Várzea Grande, município de Floresta, Paraná, onde foram selecionados 16 novilhas da raça Holandês divididas em dois tratamentos com oito repetições cada. Os tratamentos foram: T1: Controle e T2: Canola em grão. Os animais foram alimentados pelo período de 100 dias, sendo submetidos ao protocolo de sincronização folicular para colheita do líquido folicular e a avaliação ultrassonográfica do folículo dominante e do corpo lúteo. Amostras de sangue foram coletadas concomitante às aspirações foliculares, a fim de avaliar, através do plasma sanguíneo, os ácidos graxos presentes e, parâmetros metabólicos como: colesterol total, triglicerídeos, ureia, alanina aminotransferase (ALT) creatina e fosfatase alcalina (FA). Foram realizadas aspirações foliculares em quatro períodos durante o fornecimento da dieta (23, 53, 75 e 100 dias), sendo que os oócitos recuperados foram classificados de acordo com sua morfologia, e, sequentemente encaminhados para PIVE no laboratório do Centro de Biotecnologia da Reprodução Animal/ BIOTEC/ UniCesumar. Animais alimentados com canola em grão apresentaram aumento ($p < 0,05$) no número de folículos totais disponível para aspiração, sem influenciar no tamanho do

folículo dominante e do corpo lúteo. Foram coletados os dados referente ao número médio de oócitos totais, viáveis, inviáveis, taxa de clivagem e taxa de embriões. Foi constatado aumento significativo ($p < 0,05$) no número total de oócitos, incluindo os viáveis e inviáveis, em animais submetidos à dieta com canola em grão, a partir da terceira sessão de aspiração ($p < 0,0001$). Além disso, observou-se um incremento estatisticamente significativo nos números de embriões clivados ($p = 0,0001$) e de embriões totais ($p = 0,0126$). No entanto, não foram registrados efeitos nas taxas de clivagem e produção de embriões ($p > 0,05$). Adicionalmente constatou-se acréscimo na quantidade de ácidos graxos totais e ácidos graxos poli-insaturados, incluindo o C18:2n6 e C18:2n3 na circulação e no líquido folicular. Conclui-se que, novilhas da raça Holandês, alimentados com canola em grão, apresenta aumento no número de folículos totais e aumento no nível de ácidos graxos na circulação e no líquido folicular.

Palavras-chave: Ácidos graxos poli-insaturados, canola, fertilização *in vitro*, lipídios, oócitos.

ABSTRACT

Increasing dairy cow productivity in a sustainable manner is a major challenge. Physiologically, when milk production is increased so the energy demand is also increased, which can make reproduction difficult. Thus, reproduction is directly influenced by milk production and nutrition. Therefore, the objective was to evaluate the effects of supplementation with canola grain in the diet of Holstein heifers, on oocyte quantity and quality, in vitro embryo production (IVP) and blood and follicular concentrations of different fatty acids. The study was conducted at Fazenda Várzea Grande, municipality of Floresta, Paraná, where 16 Holstein heifers were selected and divided into two treatments with eight replications each. The treatments were: T1: Control and T2: Canola grain. The animals were fed for a period of 100 days, undergoing the follicular synchronization protocol to collect follicular fluid and ultrasound evaluation of the dominant follicle and corpus luteum. Blood samples were collected concomitantly with follicular aspirations, in order to evaluate, through blood plasma, the fatty acids present and metabolic parameters such as: total cholesterol, triglycerides, urea, alanine aminotransferase (ALT), creatine and alkaline phosphatase (AF). Follicular aspirations were performed in four periods during the supply of the diet (23, 53, 75 and 100 days), and the recovered oocytes were classified according to their morphology, and subsequently sent to PIVE in the laboratory of the Reproduction Biotechnology Center Animal/ BIOTEC/ UniCesumar. Animals fed with canola grain showed an increase ($p < 0.05$) in the number of total follicles available for aspiration, without influencing the size of the dominant follicle and the corpus luteum. Data were collected regarding the average number of total, viable and non-viable oocytes, cleavage rate and embryo rate. A significant increase ($p < 0.05$) in the total number of oocytes, including

viable and non-viable ones, was found in animals submitted to a diet with canola grain, starting from the third aspiration session ($p < 0.0001$). Furthermore, a statistically significant increase was observed in the numbers of cleaved embryos ($p = 0.0001$) and total embryos ($p = 0.0126$). However, no effects were recorded on cleavage rates and embryo production ($p > 0.05$). Additionally, an increase in the amount of total fatty acids and polyunsaturated fatty acids, including C18:2n6 and C18:2n3, was found in the circulation and follicular fluid. It is concluded that Holstein heifers fed with canola grain show an increase in the number of total follicles in the level of fatty acids in the circulation and in the follicular fluid.

Keywords: Polyunsaturated fatty acids, rapeseed, in vitro fertilization, lipids, oocytes.

I - INTRODUÇÃO

1.1 Introdução geral

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos tem sido uma das principais técnicas utilizadas no mundo para aumentar o número de descendentes de um animal geneticamente superior, sendo que o Brasil é considerado um dos maiores produtores mundiais de embriões bovinos produzidos *in vitro*. A técnica quando utilizada no rebanho leiteiro, além de contribuir para o ganho genético da propriedade, permite a utilização de sêmen sexado para fêmea, aprimorando ainda mais a rentabilidade da propriedade leiteira.

Os nutrientes podem afetar o desenvolvimento e a função dos órgãos reprodutivos, causar alterações no funcionamento do sistema endócrino, envolvido com a reprodução. Dentre os fatores nutricionais, a adição de gordura na dieta e mais precisamente a concentração de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), como ácido linolênico (C18:3; ômega-3) e ácido linoleico (C18:2; ômega-6), vêm ganhando destaque nas últimas décadas.

Trabalhos recentes têm demonstrado que a adição de AGPI na dieta de ruminantes melhora a qualidade oocitária, conforme sinalizam Freret *et al.* (2019), aumenta o desempenho reprodutivo, de acordo com Sinedino *et al.* (2017), Moalem (2018), Fontes *et al.* (2019), melhora a produção de blastocistos viáveis, Alves *et al.* (2021), aumenta o número de folículos grandes, como têm demonstrado Robinson *et al.* (2002), Ambrose *et al.* (2006), Bilby *et al.* (2006), diminui a mortalidade embrionária, nos estudos de Elis *et*

al. (2016) e aumenta a concentração circulante de hormônios esteroides, conforme apresentam Staples *et al.* (1998), Petit *et al.* (2002), Childs *et al.* (2008b), Scaliante-Junior (2021). Os efeitos benéficos da inclusão de AGPI na dieta dos animais ruminantes, sobre a produção de embriões parecem estar relacionados com a fonte de gordura utilizada, com a quantidade fornecida, o tempo de fornecimento, o perfil de AGs e com o método de fornecimento da fonte utilizada (Moallem *et al.*, 2018).

Dentre as fontes de gorduras disponíveis para serem utilizadas na dieta dos animais, a canola (*Brassica napus L.*) em grão, destaca-se pela composição rica em proteína, apresentando uma cápsula rígida, conferindo proteção natural ao processo de biohidrogenação ruminal, que possui em média 23 a 25,5% de proteína bruta (PB) na matéria seca (MS), além de apresentar altos teores de óleo que variam de 30 a 50% nas sementes, as quais possuem AGI como o oleico, linoleico e linolênico (Oliveira, 2017).

Novilhas taurinas leiteiras (principalmente da raça Holandês), quando manejadas adequadamente, podem atingir a puberdade com menos de um ano de idade, sendo que a idade a puberdade está relacionada ao peso corporal destes animais. O *déficit* nutricional por exemplo, retarda este crescimento, estando a nutrição diretamente ligada ao adiantamento da idade à puberdade (Hafez; Hafez, 2004; De Figueiredo *et al.*, 2008; Parry, 2016).

Animais considerados superiores geneticamente podem ser submetidos às biotécnicas da reprodução que elevam o número de descendentes. Neste contexto, a PIVE tem sido uma das principais técnicas utilizadas no mundo para aumentar o número de descendentes de um animal geneticamente superior, sendo o Brasil considerado um dos maiores produtores mundiais de embriões produzidos *in vitro* (Viana *et al.*, 2022). A técnica quando utilizada no rebanho leiteiro, além de contribuir para o ganho genético da propriedade permite a utilização de sêmen sexado fêmea, aprimorando ainda mais a rentabilidade da propriedade leiteira.

No entanto, vários fatores determinam o sucesso da técnica e seus resultados na propriedade leiteira, tais como: o estágio de lactação, o escore de condição corporal, a temperatura ambiente, o nível de produção e a nutrição das doadoras. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho avaliar a inclusão de grão de canola como fonte de ácidos graxos insaturado à dieta de novilhas da raça olandês e seus efeitos sobre a produção *in vitro* de embriões.

1.2 Metabolismo lipídico em ruminantes

Com base na estrutura química, os ácidos graxos (AGs) podem ser diferenciados em três grupos principais: ácidos graxos saturados (AGS), sem ligações duplas; ácidos graxos insaturados (AGMI), apenas uma ligação dupla e os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), com duas ou mais ligações duplas presentes na cadeia carbônica. No entanto, o que determina as funções biológicas de cada AG é o número de duplas ligações presentes, posição cis e trans do íon H e o comprimento da cadeia (Mattos *et al.*, 2000).

Os AGPI de cadeia longa podem ser divididos em três famílias principais, dependendo do local da primeira ligação dupla do lado metil: ômega 3 ou ω -3, ômega 6 ou ω -6 e ômega 9 ou ω -9 (Champe; Harvey, 1994). Todos os ω -3 e ω -6 são AGPI, enquanto a maioria dos ω -9 são AGI (como ácido oleico, C18:1 ω -9). Ambos ω -3 e ω -6 são considerados AGs essenciais, porque não podem ser sintetizados por mamíferos. No entanto, embora a molécula original de 18 carbonos de cada classe possa sofrer alongamento *de novo* e posterior dessaturação, a posição da primeira ligação dupla permanece a mesma, ressaltando que os AGs de uma família não podem ser convertidos em outra família (Mattos *et al.*, 2000).

1.3 Biohidrogenação e absorção dos lipídios

Em ruminantes a ingestão de AGs acontece na forma esterificada, principalmente na forma de triacilglicerol (TAG), esses são hidrolisados no rúmen e os AGs resultantes podem passar pelo processo de biohidrogenação (BH), mas antes da BH ocorre a isomerização, que é a inversão de um dos H da primeira dupla ligação, que se encontrava na posição cis e passa para a posição trans. Na sequência, inicia-se a BH, isto é, adição de hidrogênio nas ligações duplas até a completa, ou quase, saturação dos AGs, o que caracteriza o rúmen como o maior determinante da composição de AGs saturados nos produtos de ruminantes (Jenkins, 1993).

Dos processos de BH, os mais conhecidos e descritos na literatura são do ácido linoleico e linolênico. O principal AG biohidrogenado em animais em pastejo é o ácido

linolênico, por ser o AG mais abundante nos glicolipídios e fosfolipídios (PL) das forragens. Enquanto em animais recebendo dieta com suplementação lipídica, normalmente o ácido linoleico é o principal substrato (Lourenço *et al.*, 2010).

Os AGs quando não esterificados, ou seja, em sua forma livre são sensíveis a ação das bactérias ruminais, esses microrganismos biohidrogenizam os AGI, este procedimento converte AGI em AGS (Oliveira *et al.*, 2004). Este processo é uma evolução adaptativa das bactérias no rúmen para reduzir a quantidade de AGPI que são mais tóxicos (Tanaka, 2005). Em consequência ocorre grande modificação dos lipídios no rúmen, ocasionando diferenças marcantes entre o perfil de AG dos lipídios da dieta, e os lipídios que derivam do rúmen são os AGS (Harvatine; Allen, 2004).

Embora os ácidos linoleicos (18:2) e linolênicos (18:3) sejam os principais AGPI na alimentação de ruminantes, a BH ruminal faz com que o ácido esteárico (C18:0) seja o principal ácido a sair do rúmen. Por esta razão, a gordura dos ruminantes é mais saturada do que a carne dos monogástricos (Palmquist; Mattos, 2006). Todo o processo de BH é dependente do pH do rúmen, e conforme o pH torna-se ácido, a porcentagem de AGs biohidrogenados diminui. Além disso, os AGs devem estar na forma não esterificada para que ocorra a BH (Palmquist; Mattos, 2006).

A proporção de lipólise e BH depende do tipo e quantidade de gordura que atingem o rúmen e, como dito anteriormente, do pH ruminal (Beam *et al.*, 2000). O nível de saturação dos lipídios influencia na digestão e absorção de gorduras, os saturados são hidrolisados mais rápido, mostram-se menos prejudicial ao metabolismo dos microrganismos do rúmen do que as insaturadas (Jenkins, 1993; Oldick *et al.*, 1997).

A digestão intestinal ocorre pela entrada da emulsão bruta no trato gastrintestinal médio, misturando com a bile e o suco pancreático. A lipólise ocorre pela ação da lipase do suco pancreático sobre os TAG produzindo diacilglicerol (DG), monoacilglicerol (MG) e ácidos graxos não esterificados (AGNE) (Hell *et al.*, 2012). Os lipídios da dieta de ruminantes DG, MG e AGNE são convertidos em microemulsões pela ação dos ácidos biliares. MG e AGNE são absorvidos por difusão simples. Uma vez dentro da célula da mucosa intestinal o MG e o AGNE vão para o retículo endoplasmático e são remontados em TAG e emulsificados em quilomícrons, que são liberados em pequenas vesículas que viajam até a membrana e ejetam os quilomícrons nos vasos linfáticos em um processo chamado exocitose (Hell *et al.*, 2012).

Os sais biliares não são absorvidos no duodeno, mas no íleo por transporte ativo. O glicerol é rapidamente absorvido pelas células intestinais por difusão passiva. O colesterol só é absorvido na forma livre. Hidrolases pancreáticas ou da borda em escova dividem ésteres de colesterol para formar colesterol livre, que são reesterificados após a absorção para converter novamente em ésteres de colesterol (Hell *et al.*, 2012).

1.4 Novilhas leiteiras na reprodução

A criação de novilhas leiteiras de reposição de alta qualidade é de suma importância para garantir alta produtividade e longevidade das fazendas leiteiras. Assim, o manejo nutricional e a reprodução para início da atividade reprodutiva objetivando o primeiro parto aos 24 meses e alta atividade ovariana com a inclusão de AGs essenciais à dieta é uma alternativa (Caldari-Torres *et al.*, 2011). Tal inclusão melhora o perfil energético dos animais e diminui a ingestão de MS, visto que o efeito no consumo de MS com a incorporação de lipídios na dieta pode ser atribuído a alta concentração sérica de AGI, que ativam receptores do centro da saciedade localizados no hipotálamo, inibindo o apetite e reduzindo o consumo (Allen, 2000). No entanto, deve-se respeitar o limite máximo de 6% da adição de extrato etéreo (EE) com base na MS (Gandra *et al.*, 2016).

As novilhas de raças leiteiras, em geral, atingem a puberdade em idade menor do que as novilhas de raças de corte. E, são consideradas púbere quando for capaz de produzir gametas e de manifestar todos os eventos do comportamento do cio, ovular e produzir um corpo lúteo funcional (Figueiredo *et al.*, 2008; Perry, 2016; Souza *et al.*, 2018). No entanto, cuidados devem ser tomados para que o ganho de peso até a puberdade não prejudique o desempenho produtivo destas novilhas. Este ganho de peso não deve exceder 800 g por dia (Serjzen; Purup, 2007).

Em novilhas o início da puberdade normalmente ocorre aos 9-11 meses de idade e peso vivo médio variando entre 250-280 kg, entretanto, estes preceitos podem variar amplamente, tanto dentro de raças quanto entre raças (Hafez; Hafez, 2004). Sendo assim, para Parry (2016) a idade da puberdade está mais relacionada ao peso corporal, e fatores hereditários, pois há genes que controlam o momento da puberdade de novilhas na visão de Cardoso *et al.* (2018).

O déficit nutricional retarda o crescimento de animais jovens, sendo que a nutrição está diretamente ligada ao adiantamento da idade à puberdade (De Figueiredo *et al.*, 2008; Perry, 2016). A idade da entrada à puberdade tem grande relevância na competência reprodutiva, produtiva e especialmente econômica dentro do sistema de produção, de leite ou corte. No decorrer do período de puberdade da fêmea um mecanismo de retroalimentação positiva se estabelece, o nível de secreção de gonadotrofinas amplia de forma pulsátil resultando no progressivo aumento de estrógeno (Hafez; Hafez, 2004; Souza *et al.* 2018). Fica claro que a nutrição de novilhas leiteiras influencia a chegada da puberdade, além da idade ao primeiro parto, pois alterações nutricionais podem influenciar diretamente o desempenho reprodutivo (Armstrong *et al.*, 2003; Webb *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2008).

Entre as principais vantagens em emprenhar as novilhas mais jovens estão: menor tempo para obter retorno do investimento, aumento da vida reprodutiva da vaca e aumento do número de bezerros (Short *et al.*, 1994). Para que esses fatores ocorram sem prejuízos aos animais é necessário uma nutrição adequada, portanto, os nutrientes utilizados na dieta do animal têm que estar devidamente balanceados, tanto os proteicos que podem ser o farelo de soja, caroço de algodão, farelo de algodão, farelo de canola, farelo de girassol e farelo de amendoim, quanto os energéticos como, o milho, a aveia, o farelo de arroz, o farelo de trigo, a polpa cítrica, o sorgo, a mandioca e subproduto como o melaço (Duffield *et al.*, 2003).

Pesquisas têm demonstrado que a adição de fontes de gordura nas dietas de bovinos pode influenciar positivamente a reprodução das fêmeas, pela alteração do ambiente folicular ovariano e função do corpo lúteo (CL), por melhorar o status energético e pelo aumento dos precursores das sínteses dos hormônios reprodutivos como os esteroides estradiol (E2) e as prostaglandinas (PGs) (Mattos *et al.*, 2000; Scaliante-Junior, 2021). Esses hormônios podem diminuir a retenção placentária, contribuir para a implantação embrionária, as taxas de concepção e o retorno a ciclicidade (Costa; Fontes, 2010).

Com relação a gordura na nutrição desses animais, é sabido que alterando o teor de AGs total da dieta ocorre alteração sobre a distribuição de AGs nos tecidos reprodutivos (Bilby *et al.*, 2006) e alteração na composição (Sinedino *et al.*, 2017). A suplementação dietética em novilhas de corte com elevada inclusão de óleo de peixe (fonte rica de AG ω -3) aumentou significativamente a quantidade de AGPIs ω -3 totais no fluido folicular (Childs *et al.*, 2008a). Esta mudança foi significativamente relacionada

com o acréscimo dos níveis de ω -3 no plasma sanguíneo, e essa alteração do perfil dos AGs no fluido folicular tem influência sobre o desenvolvimento de oócitos.

Nogueira *et al.* (2012) também observaram aumento na quantidade de oócitos produzidos ao fornecer 200 gramas de Megalac de óleo de soja/dia para novilhas de corte quando comparado aos animais do grupo controle.

1.5 Canola

Canola (*Brassica napus* L.) é o nome dado a uma variedade de Colza espécie oleaginosa, da família *Brassicaceae*, desenvolvida no Canadá e cultivada no mundo. Originada do cruzamento da Colza (*Brassica oleracea* L.) e do nabo silvestre (*Brassica campestris* L.), da qual resultou uma planta denominada CANOLA – “*Canadian oil low in erucic acid*”, que significa “Óleo Canadense com baixo teor de ácido erúxico” (Nosheen *et al.*, 2011). Assim, para ser classificada como canola o material deve possuir menos de 2% do total de AGs na forma de ácido erúxico e menos de 30 μ moles de glucosinatos por grama de MS da semente, conforme registrado pelo *Canadian Council of Canola* (Canola Council of Canada, 1999).

Segundo dados da USDA (2021), o Canadá é o maior produtor mundial e exportador de grãos da cultura, apresentando na safra 2019/2020 aproximadamente 19,6 milhões de toneladas de grãos, representando 28,3% de toda a produção mundial, em segundo vem a União Europeia 24,4% e a China 19,5%.

A Conab (2018) ressalta que no Brasil a canola é cultivada principalmente na região sul, sobretudo nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor da cultura em esfera nacional; que é incorporada nos sistemas de produção como excelente alternativa econômica para o uso de rotação de culturas possibilitando a produção de óleos vegetais no período do inverno (Albuquerque *et al.*, 2009; De Mori *et al.*, 2014). A produção total do grão de canola no país no ano de 2022 foi de aproximadamente 96,2 mil toneladas, e estimativa para 2023 é de 102,7 mil toneladas sendo designado especialmente para a indústria de alimentos (Conab, 2023). Mundialmente, após a soja, a canola é a maior cultura de grãos oleaginosos e o cultivo tem como principal objetivo a extração de óleo dos grãos por possuir alto teor em lipídios (30% a 50% de EE e 23% a 25% de PB (Bett *et al.*, 1999; Oliveira, 2017).

O maior uso é para o consumo humano, pela elevada concentração de gorduras insaturadas, sendo 65% de ácido oleico (C18:1), 16% de ácido linoleico (C18:2), 7,5% de ácido linolênico (C18:3) (Farahmandfar, 2015); produção de biodiesel e, secundariamente, de farelo empregado na formulação de rações em função da qualidade, bem como da produtividade estável e competitiva (Micuanski *et al.*, 2014).

O farelo possui teor de PB próximo de 34%, representando potencial para utilização na alimentação animal (Bertol; Mazzuco, 1998). É uma opção ao farelo de soja como fonte de proteína (Chavarria *et al.*, 2011; Lovatto, 2016). Há descrições nacionais sobre aptidão do farelo de canola na alimentação de aves, Gopinger *et al.* (2013) de suínos Zanotto *et al.* (2009); Scherer *et al.* (2015); Lovatto (2016); e de ruminantes, Leggi *et al.* (1998); Hentz (2010). No entanto, para a inclusão desse subproduto na alimentação animal, a composição de nutrientes deve ser conhecida para o correto estabelecimento dos teores a serem adicionados à ração animal (Pena *et al.*, 2010).

1.6 Grão de canola inteiro no desempenho reprodutivo

O desempenho reprodutivo de bovinos é afetado por inúmeros fatores, entre eles a nutrição ocupa espaço majoritário, principalmente em relação a energia necessária para os animais em estágio reprodutivo (Costa; Fontes, 2010). Níveis nutricionais inadequados têm potencial para afetar o desenvolvimento e a função dos órgãos reprodutores, acarretando alterações do funcionamento do sistema endócrino (Robinson *et al.*, 2006).

Várias fontes de lipídios podem ser usadas na dieta de ruminantes, desde o óleo de soja - Vargas *et al.* (2002), até fontes protegidas de origens vegetais ou animais - Hightshoe *et al.* (1991), e sementes inteiras de oleaginosas (Talavera; Williams, 1985; Williams, 1989). Dentre as inúmeras fontes de gorduras disponíveis no Brasil têm-se a canola, girassol, soja, caroço de algodão e linhaça que são fontes de alimentos energéticos, proteicos, ricos em minerais, fibras, AGPIs (Cavalieri *et al.*, 2005; Petit *et al.*, 2008; Neves *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2012; De Marchi *et al.*, 2015; Cardoso *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2020).

Quando fornecida na forma de grão, a gordura possui liberação lenta diminuindo a biohidrogenação ruminal (Cavalieri *et al.*, 2005) e fazendo com que a gordura chegue

em maior quantidade ao intestino para ser absorvida, e assim, produzir melhora no perfil reprodutivo.

As oleaginosas em grãos são menos danosas à digestão de fibras do que lipídios ou óleos livres, o fornecimento ocorre lentamente pela regurgitação e ruminação do grão. Por se tratar de grãos inteiros cercados por uma camada de proteína que atua como casca protetora, dessa forma, espera-se que ocorra a biohidrogenação reduzida no rúmen (Pesce, 2008).

A maioria dos lipídios vegetais presentes em pastagens são insaturados. Na maioria dos grãos de oleaginosas, como caroço de algodão, grão de soja e sementes de girassol, o ácido linoleico prevalece (C18:2), enquanto o ácido α -linolênico (C18:3) é o AG mais comum em forragens. Faz exceção os grãos de canola e de amendoim que são ricos em ácido oleico (C18:1) (Palmquist; Mattos, 2006).

De fato, a canola é fonte de lipídios, rica em AGPI como o ácido linoleico (ω -6), linolênico (ω -3) e oleico (ω -9) (Santos *et al.*, 2014). Pouco se conhece sobre a ação do ω -9, sabe-se que em ratos com dietas ricas em gordura monoinsaturada melhorou a sensibilidade à insulina e diminuiu a inflamação (Finucane *et al.*, 2015).

A canola além de ser rica em ω -9 tem boa fonte de AG ω -3 e a proporção de 2: 1 de ω -6 para ω -3 é nutricionalmente ideal. Destaca-se como fonte de minerais e por ser rica em vitaminas como colina, biotina, ácido fólico, niacina, riboflavina e tiamina (Santos *et al.*, 2014). Estudos relataram os efeitos benéficos na utilização de grãos de oleaginosas na dieta de doadoras de oócitos bovinos, como o aumento da concentração circulante de hormônios esteroides (Petit *et al.*, 1998), aumento do número de folículos grandes (Ambrose *et al.*, 2006), melhora na produção de embriões *in vivo* (Muller *et al.*, 2009).

Albuquerque *et al.* (2009) trabalharam com vacas da raça Nelore alimentadas com Canola e Linhaça em grão e observaram, após 83 dias de alimentação, que os animais alimentados com Canola em grão apresentaram aumento na proporção de ácido Linolênico (C18:3n3) na carne, quando comparado a linhaça em grão e os animais do grupo controle.

Com objetivo de analisar a produção de oócitos e de embriões de vacas Nelore *in vitro* e a resistência à vitrificação, Domingues *et al.* (2014) avaliaram 12 vacas Nelore

distribuídas em dois tratamentos: com canola em grão (2,0 kg/ animal/ dia) e controle. Os animais passaram por quatro sessões de OPU, e os oócitos foram submetidos à PIVE, após vitrificados os autores não observaram diferenças no número total de oócitos, número de oócitos viáveis, na taxa de clivagem e na taxa de blastocistos, porém, os embriões resultantes de oócitos coletados de vacas alimentadas com canola foram mais resistentes à vitrificação.

Portanto, a suplementação lipídica na dieta de ruminantes é uma forma eficaz de atender as demandas energéticas e, quando os lipídios estão na forma protegida contendo AGs de cadeia longa, aumentam o potencial de absorção intestinal. Contudo, ainda são necessárias mais pesquisas a fim de avaliar os efeitos da inclusão de canola em grão na alimentação de bovinos.

1.7 Ácidos graxos na reprodução de fêmeas bovinas

Na reprodução de bovinos, principalmente leiteiros, a nutrição influencia a fertilidade de machos e fêmeas (Armstrong *et al.*, 2003; Webb *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2008). Exatamente por meio do fornecimento de nutrientes específicos, que são indispensáveis para o desenvolvimento do folículo, maturação oocitária, ovulação, fertilização, sobrevivência embrionária e instalação da gestação, pois a nutrição é refletida na expressão e funcionamento de rotas metabólicas que permitirão ao animal expor toda sua competência reprodutiva (Sklan *et al.*, 1991; Garcia Bojalil *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 2006).

Quando os nutrientes são absorvidos pelos ruminantes atendem a uma ordem de exigências, como o metabolismo basal, crescimento, reservas corporais básicas, lactação, acúmulo de reservas corporais, ciclo estral e início da gestação. Por esse motivo o animal só transmitirá nutrientes para a atividade reprodutiva quando todas as necessidades anteriores forem atendidas (Sant *et al.*, 2018).

É perceptível que a energia é o fator mais crítico que afeta a reprodução desses animais, mostrando que a ingestão insuficiente da mesma ocasiona baixo desempenho reprodutivo, como o atraso na idade à puberdade, retardo no intervalo da primeira ovulação e cio, pós-parto e redução nas taxas de concepção e de prenhez em vacas de

corde e de leite (Lamb, 2003; Santos *et al.*, 2005). Além de acarretar alterações do funcionamento do sistema endócrino envolvidos na reprodução.

Os lipídios são a principal forma de reserva de energia das células e tornam-se indispensáveis na dieta desses animais, é essa reserva que irá suprir as necessidades energéticas requisitadas durante os processos da reprodução como: maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, através da oxidação dos AGs para a produção de adenosina trifosfato (ATP) realizada na matriz mitocondrial (Dunning *et al.*, 2014; Carrillo-González *et al.*, 2023; Zeng *et al.*, 2023).

O TAG é o maior componente lipídico intracelular e mais abundante no citoplasma da célula dos mamíferos (Sturmey *et al.*, 2009), são formados por uma molécula de glicerol que se ligam a três moléculas de AGs, podendo ser saturados, insaturados ou ambos, sendo depositados na forma de gotículas lipídicas e constituem fonte de energia para os oócitos e embriões. Já os PL principais constituintes da membrana celular são formados por um glicerídeo, um glicerol unido a AGs combinados com um fosfato (Van Meer *et al.*, 2008).

O colesterol é a fonte primária para a síntese de hormônios esteroides em mamíferos, composto por quatro anéis de carbonos interligados, unidos a hidroxilas, oxigênio e cadeias carbônicas, que parece ser sintetizado no fígado e nas células intestinais (Bionaz *et al.*, 2020), ou obtido da alimentação, sendo absorvido no intestino e transportado no sangue (pelas lipoproteínas) até os tecidos, e compõe as membranas das células (Murray *et al.*, 2006).

Segundo Grummer e Carrol (1991), a concentração de colesterol é aumentada pela suplementação de gordura na dieta, além do mais, o colesterol é importante componente na formação dos quilomícrons durante o processo de absorção de gordura no intestino delgado, desta forma, conforme a ingestão de gordura aumenta, mais quilomícrons são formados e mais colesterol passa a ser sintetizado (Thatcher; Staples, 2000).

O colesterol é precursor dos hormônios esteroides como a P4 e E2, sendo estes produzidos pelo tecido ovariano através da captação de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e baixa densidade (LDL) no sangue, pelas células ovarianas, por serem lipossolúveis conseguem atravessar a membrana plasmática das células (Thatcher; Staples, 2000; Murray *et al.*, 2006).

As lipoproteínas são constituídas de moléculas de colesterol e outros tipos de lipídios associados às proteínas do sangue, as chamadas apoproteínas interligadas, unidas as hidroxilas, oxigênio e cadeias carbônicas, que podem ser sintetizados no corpo (principalmente no fígado) ou obtidos da alimentação, sendo absorvidos no intestino e transportados no sangue (pelas lipoproteínas) até os tecidos, e compõem as membranas das células (Berg *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2006). As lipoproteínas LDL, HDL e VLDL diferem em densidade, tamanho e na constituição. De baixa densidade (LDL) (a sigla vem do inglês low density lipoprotein), as VLDL de muito baixa densidade (very low density lipoprotein) e as lipoproteínas alta densidade (HDL) (high density liprotein) (Berg *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2006). Sua função é carregar diferentes tipos de gorduras no sangue, caso contrário seria difícil transportá-las porque não são solúveis nos fluidos corporais. Assim, por exemplo, as VLDL carregam os TAG sintetizados no corpo até os tecidos em que são necessários (Murray *et al.*, 2006).

Fontes *et al.* (2019) mostraram em seus estudos que a suplementação com AGPI, alterou o perfil lipídico plasmático e favoreceu a performance reprodutiva de fêmeas bovinas. Tendo em vista que os AGs são cofatores enzimáticos, parte desses AGs é disponibilizada para a síntese de importantes hormônios envolvidos no ciclo estral das fêmeas bovinas; como o E2, P4 e PGs, sendo o colesterol o precursor para esses hormônios esteroides (Wonnacott *et al.*, 2010).

Freret *et al.* (2019) avaliaram os efeitos dos AGPIs, ω 3 e ω 6, em 37 doadoras de oócitos da raça Holandês, sendo 18 doadoras, suplementadas com óleo de peixe encapsulado rico em ω 3 e 19 doadoras no tratamento controle receberam óleo de soja encapsulado rico em ω 6, ambos tratamentos na quantidade de 1% da MS, essas doadoras foram suplementadas por 9 semanas, após 11 semanas do parto. Todas as doadoras foram submetidas a 5 sessões de aspiração folicular (OPU) e, posteriormente, submetidas ao protocolo de produção *in vitro* de embriões (PIVE). Em seus resultados foi observado que a suplementação com ω 3 teve aumento significativo no número de blastocistos com relação ao controle, 49,6% vs 42,3%, respectivamente, e aumento significativo na taxa de blastocisto de boa qualidade (blastocistos congeláveis) foi relatada em vacas recebendo ω 3 (42,2%) em comparação com vacas controle ω 6 (32,7%). Verificaram também, após uma avaliação através da espectrometria de massa MALDI-TOF, uma diferença significativa na composição lipídica ω 3 e ω 6 e 42 lipídios identificados estavam envolvidos principalmente na estrutura da membrana celular, portanto, puderam concluir

que a suplementação com ω 3 melhorou a qualidade do oócito e modificou a composição lipídica.

Fouladi-Nashta *et al.* (2007) examinaram os efeitos do nível de AGs protegidos do rúmen, sobre a competência dos oócitos em vacas leiteiras em lactação, alimentadas com 200 ou 800 gramas por dia com sais de AGs (Megalac - de óleo de coco) no período de 40-60 dias pós parto, os autores observaram, após 7 sessões de OPU, que os animais alimentados com 800 gramas de Megalac/dia apresentaram aumento na taxa de blastocisto (38,0%), quando comparado aos animais do grupo controle (29,1%), bem como a quantidade de massa celular interna do embrião quando comparado ao grupo de baixo teor de gordura (200 g/dia).

Moalem *et al.* (2013) observaram após 20 sessões de Opu realizadas 2 vezes por semana em 21 vacas da raça Holandês doadora de oócitos, suplementadas com AGS, óleo de linhaça ou de peixe encapsulado, durante 100 dias, demonstraram que a taxa de clivagem foi maior em ambos os grupos tratados com ω -3, grupo linhaça e óleo de peixe encapsulado (52% e 48%) respectivamente do que as vacas tratadas com AGS (35%).

Ponter *et al.* (2012) avaliaram a influência do tipo de lipídios da dieta de novilhas da raça Holandês sobre o número e a qualidade dos oócitos e sobre a produção *in vitro* de embriões. Novilhas foram alimentadas durante 42 dias com dieta suplementada com linhaça, rica em ácido linolênico (C18:3, ω -3) e soja, rica em ácido linoleico (C18:2, ω -6), com relação de ω -6/ ω -3 de 0,46 e 2,58, respectivamente. Os autores não observaram alteração no número e na qualidade dos oócitos coletados, no número de oócitos fertilizados e clivados e na quantidade e qualidade dos embriões produzidos *in vitro*.

Moallem (2018) em sua revisão mostrou que os efeitos benéficos obtidos com a alimentação com ω -3, pelo menos para o sistema reprodutivo em vacas e touros, podem ser alcançados com a suplementação de ácido α -linolênico (ALA) de linhaça, enquanto nenhuma vantagem foi vista na alimentação com relação a duração do tratamento de ω -3 de óleo de peixe - EPA e DHA - sobre a alimentação de sementes de linhaças sozinhas. Outro ponto importante é o tempo necessário para a incorporação do ω -3 dietético nos tecidos-alvo; isso foi particularmente saliente em touros, que um período de 6 a 7 semanas é necessário para atingir a infiltração esperada de ω -3 dietético no espermatozoide, mas, aplica-se a vacas.

Ambrose *et al.* (2006) mostraram que vacas da raça Holandês suplementadas com linhaça ou girassol (~750 g de óleo/dia) por 32 dias após a inseminação, apresentaram folículo ovulatório maior e as perdas gestacionais foram de 9,8% em vacas alimentadas com linhaça encapsulada em comparação com 27,3% aquelas alimentadas com girassol encapsulado.

Elis *et al.* (2016) estudaram os efeitos da suplementação de AGPI ω -3 na forma de óleo de peixe encapsulado 1% de ingestão de matéria seca (CMS); $n = 23$), ou seja, protegido no rúmen sobre as variáveis de produção e reprodução em vacas da raça Holandês em lactação, seu controle foi a soja torrada (ω -6) 1,8% CMS; $n = 23$). Suplementos foram adicionados à dieta entre o parto e 2 meses após o parto para avaliar o efeito no crescimento e maturação dos folículos ovarianos a partir dos quais a ovulação ocorreu próximo ao dia da inseminação (IA). Concluíram que houve tendência de aumento do número de folículos grandes (diâmetro ≥ 10 mm) com a suplementação dietética ω -3 e a diminuição na infertilidade ou na taxa de mortalidade embrionária precoce 21 dias após a IA sendo 13,5% com fornecimento de ω -3 e 38,8% no grupo ω -6. Sugerindo que o efeito observado nas variáveis ovarianas não está associado ao efeito no suprimento de energia apenas e nas variáveis metabólicas, e sim específico da suplementação com ω -3.

Zachut *et al.* (2010) suplementaram vacas com óleo de linhaça e girassol encapsulado (ω -6) a 3,8% da MS monitoraram os ovários por ultrassonografia quanto ao status folicular, O número médio de folículos de 2 a 5 mm nos dias 5 e 9 do ciclo foi maior nas vacas alimentadas com óleo de linhaça (ω -3) encapsulado do que naquelas alimentadas com óleo de girassol (ω -6), enquanto o número médio de folículos ≥ 10 mm nos d 5, 9 e 13 foram maiores naqueles alimentados com óleo de girassol do que naqueles alimentados com óleo de linhaça encapsulado e controles. No entanto, Moussavi *et al.* (2007) observaram aumento no número de folículos médios (5-10 mm) nos animais alimentados com óleo de peixe (ω -3).

Os AGPIs podem aumentar a fertilidade em ruminantes bovinos de várias maneiras. Nos ovários há relatos de efeito dos AGs sobre o número e tamanho de folículos ovarianos, conforme apresentaram Robinson *et al.* (2002); Bilby *et al.* (2006); Ambrose *et al.* (2006); Elis *et al.* (2016), tamanho do CL - Vasconcelos *et al.* (2001); Raes *et al.* (2004); Bilby *et al.* (2006) e na qualidade oocitária - Kim *et al.* (2001); Zeron *et al.* (2002).

Além disso, outros estudos também observaram influência de dietas contendo AGs sobre a qualidade embrionária - Childs *et al.* (2008a); Cerri *et al.* (2009b) em cabras (Alves *et al.*, 2021) e a concentração circulante de PGs e hormônios esteroides (Petit *et al.*, 2002; Childs *et al.*, 2008b).

Robinson *et al.* (2002) observaram aumento no número de folículos de tamanho médio (5 a 10 mm) na primeira e na segunda onda folicular, após a sincronização do estro em vacas da raça Holandês que foram suplementadas com fonte de energia rica em ácido linolênico (LinPreme[®]) e ácido linoleico (SoyPreme[®]), comparado ao grupo controle. Os autores também verificaram aumento no tamanho do primeiro folículo dominante nos animais tratados, em relação ao grupo-controle. Os mesmos autores observaram que vacas suplementadas com LinPreme[®] (ω -3) tiveram folículos dominantes de maior diâmetro quando compararam as vacas que receberam suplementação com SoyPreme[®](ω -6) e controle.

Os benefícios dos AGPIs na reprodução também foram observados na maturação oocitária *in vitro* (MIV) - Fouladi-Nashta *et al.* (2009), e *in vivo* - Zeron *et al.* (2002), havendo melhoras significativas quando acrescentados a dieta das doadoras de oócitos e adicionados ao meio de MIV o suplemento com ω -3 de cadeia longa e cadeia curta. É sabido que a suplementação dietética tem efeito significativo na reprodução de ruminantes, definindo os nutrientes que constituem o fluido folicular, que é composto por aminoácidos e proteínas, lipídios, citocinas, fatores de crescimento, hormônios esteroides, eletrólitos e metabólitos (Khajeh *et al.*, 2017). A composição do fluido folicular é semelhante a do plasma venoso e pode ajudar a favorecer a PIV de embriões bovino (Sinclair *et al.*, 2008).

Alves *et al.* (2021) investigaram os efeitos da suplementação durante 28 dias com dietas ricas em lipídios ou precursores de glicogênio sobre fluido folicular, a expressão de genes mitocondrial, oócitos e embriões *in vitro*, de cabras leiteiras multíparas adultas. Sete dias antes do término do período da alimentação, sementes de linhaça moídas na base de 10,5% MS (Grupo Linhaça - GF, n = 10), ou uma solução de 200 mL/cabra/dia de glicerina bruta em água, na proporção de 9: 1 (Grupo Glicerina 80% - GG, n = 10) foram adicionados à dieta DTM. O Grupo Controle (GC) foi mantido na dieta DTM (n = 10). Os ovários foram coletados no abate para coleta do conteúdo folicular. As concentrações de glicose, colesterol e TAG e a atividade da glutathione peroxidase foram determinadas no fluido folicular, e a expressão dos genes Cox-1, NRF-1, PPARGC1-A e

GDF-9 realizada em células da granulosa e em oócitos por qPCR. Após a coleta, os oócitos foram maturados *in vitro* por 24 h para serem ativados e posteriormente, cultivados *in vitro* por sete dias até o estágio de blastocisto. Concluíram que a concentração de glicose intrafolicular foi maior no grupo glicerina e a atividade da glutatona peroxidase no grupo linhaça, e todos os genes foram expressos nas células da granulosa e nos oócitos, com maior expressão de NRF-1 nos oócitos do grupo glicerina. Porém, o grupo linhaça sobressaiu apresentando maiores taxas de blastocisto de qualidade superior sob o grupo controle.

A suplementação da dieta com gorduras favorece a síntese hormonal, inclusive a esteroidogênese folicular e luteal e de PGs, via inibição de enzimas que atuam na conversão do ácido araquidônico, além de potencializar as ações de fatores de crescimento, especialmente o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e o fornecimento de nutrientes para todos os eventos da foliculogênese ovariana (Armstrong *et al.*, 2002; Urlep; Rozman, 2013; Tessaro *et al.*, 2015). Essa suplementação também, amplia a concentração de colesterol no fluido folicular (Ruas *et al.*, 2000), precursor da síntese de P4. Conforme descrito por Petit *et al.* (2002), vacas que foram suplementadas com gordura protegida apresentaram elevados níveis de ω -3 e obtiveram um CL de diâmetro maior. Concluíram que quando os níveis de ácido linolênico aumentam na dieta pode haver níveis baixos de PGF2 α , melhorando as taxas de gestação.

Assim, os AGPI ω -3 e ω -6 são as principais famílias que afetam a fertilidade. O ácido linoleico dietético é um dos representantes da família ω -6, o qual é convertido em ácido araquidônico, precursor das PGs dienoicas, como a PGF2 α . Por outro lado, o ácido linolênico ω -3 é convertido a ácido eicosapentaenoico precursor das PGs trienoicas, como PGF3 α . Deste modo, a produção das PGs pode ser manipulada de acordo com a proporção de AGs presentes na dieta (Urlep; Rozman, 2013; Tessaro *et al.*, 2015).

Posto isto, os AGs podem alterar algumas vias bioquímicas e intervir no metabolismo de alguns hormônios (esteroides e eicosanoides) que articulam os processos metabólicos nos ovários e no útero, além de ter efeitos diretos na transcrição de genes que codificam proteínas essenciais à reprodução (Staples *et al.*, 1998). Os mecanismos pelos quais a suplementação melhora o desempenho reprodutivo parecem envolver, principalmente, aumentos na capacidade funcional do ovário, na concentração de P4 circulante e na vida útil do CL (Armstrong *et al.*, 2001; Boken *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2023).

Os AGIs podem influenciar os processos reprodutivos através de uma variedade de mecanismos; eles proporcionam os precursores para a síntese de PGs e podem modular o modelo de expressão de muitas enzimas-chave envolvidas no metabolismo de esteroides e PGs (Wathes *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008). Nos ruminantes a regressão luteal é causada pela secreção de PGF2 α liberada pelo endométrio em resposta à ocitocina produzida pelo CL. Quando ligada ao receptor no tecido uterino, a ocitocina leva à ativação da fosfolipase C (PLC) e fosfolipase A2 (PLA2), que causam a liberação de ácido araquidônico e seu metabolismo subsequente, via ciclo-oxigenase para síntese de PGF2 α (Furtado *et al.*, 2011; Pugliesi *et al.*, 2017).

Neste sentido, sabe-se que o ácido linolênico e os AGPIs de cadeia longa EPA e DHA, agem como inibidores competitivos durante o metabolismo do ácido araquidônico pela enzima prostaglandina sintase, no processo de síntese das PGs. Acredita-se que o dispositivo de inibição seja pela competição do ácido linolênico com o ácido araquidônico quando o ácido se liga à enzima ciclo oxigenase (Thatcher *et al.*, 1995).

Petit *et al.* (1998) verificaram que a fonte de AGs ω -6 ou ω -3 afeta a taxa de prenhes e observaram que vacas leiteiras de alta produção apresentaram 50% de gestação quando foram alimentados com fontes de AG ω -9 e ω -6 (megalac[®]) e 89% de gestação para as vacas alimentadas com ω -3 (grãos de linhaça). Os principais mecanismos pelos quais a inclusão de gordura na dieta influencia as variáveis reprodutivas podem estar relacionadas com o aumento das concentrações sanguíneas de P4, hormônio essencial para a manutenção da gestação.

Quando bovinos recebem suplementação com lipídios, principalmente AGPIs como o (ω -3 e ω -6), podem aumentar a concentração plasmática de P4, esta suplementação pode levar a altos níveis séricos de colesterol HDL que propicia a ocupação por lipídios na área estrogênica da célula do CL e, conseqüentemente, aumenta a síntese de P4 lútea, hormônio importante na manutenção da gestação (Furtado *et al.*, 2011). Estudos com oócitos e embriões de mamíferos realizados por Bender *et al.* (2010), provaram que o teor de lipídios tem a capacidade de influenciar a maturação oocitária, fertilidade e desenvolvimento embrionário *in vitro*. Além disso, os lipídios juntamente com os AGs são contribuintes essenciais para integridade estrutural, funcional e metabólica do embrião pré-implantado.

1.8 Ácidos graxos na nutrição de vacas leiteiras

O desempenho reprodutivo em vacas é influenciado pelo estado nutricional e metabólico, conforme revisado anteriormente (Leroy *et al.*, 2008). A gordura dietética tem sido usada para melhorar o *status* reprodutivo.

Em rebanhos leiteiros o principal fator que contribui com a manutenção do equilíbrio entre a produção e a sanidade é a nutrição. Em uma escala de pontos de condição corporal de vacas de leite que varia de 1 a 5, um animal em lactação com o reestabelecimento de sua condição corporal deve apresentar 3,25 a 3,75 pontos, a fim de evitar problemas metabólicos e nutricionais (Wildman *et al.*, 1982).

Doenças metabólicas são causadas por um desequilíbrio nutricional aparente no organismo animal como minerais, água, proteínas e carboidratos, os quais advêm da utilização de alimentos incapazes de atender as exigências de manutenção, gestação e/ou produção, assim, o animal utiliza suas reservas para se manter, porém, quando esse desequilíbrio é moderado, persistente ou severo, ocorre o esgotamento corporal das reservas corporais ocasionando às doenças (Humer *et al.*, 2018).

Paiva *et al.* (2013) afirmaram que a funcionalidade do metabolismo animal depende de dois ingredientes principais: a energia e a proteína, que devem apresentar níveis compatíveis com a exigência de cada animal para cada fase, que ele se mantenha, produza e armazene reservas. Minerais, vitaminas e aditivos também são nutrientes importantes para a nutrição de vacas de leite, provendo o desenvolvimento progressivo do animal (Goes *et al.*, 2013).

As dietas tradicionais para vacas leiteiras normalmente têm baixa concentração de EE (cerca de 2,5 a 3,5% da MS dietética). As fontes mais comuns de oleaginosas fornecidas as vacas leiteiras são soja, milho e caroço de algodão, mas outras incluem canola, linhaça e girassol. Além disso, vários subprodutos vegetais e animais que contêm gordura ou óleo como grãos de destilaria são comuns em dietas de ruminantes (Jenkins, 1993).

Suplementos de gordura são considerados fontes de energia, e as crescentes necessidades de energia da vaca leiteira de alto rendimento levaram ao aumento constante no uso de suplementos de gordura na nutrição de ruminantes. No entanto, aumentar a proporção de gordura na dieta pode ser prejudicial ao crescimento bacteriano e à

digestibilidade, juntamente com outros efeitos negativos (Jenkins, 1993). Esses efeitos adversos da suplementação de gordura podem ser reduzidos pelo uso de gorduras protegidas do rúmen, que passam pelo rúmen parcialmente intacta com a gordura liberada para digestão no intestino delgado.

É sabido que se aumentar a concentração de gordura na dieta, adicionando mais de 3% da MS aumenta significativamente o status reprodutivo de vacas leiteiras, como: alteração da concentração de progesterona (P4) no sangue, tamanho do ovário, número de oócitos, ajuste para a regressão do CL, taxa de fertilização e prenhez (Staples *et al.*, 1996).

Os lipídios da dieta podem estar na forma de AG livres ou AG complexados, como os TAG. As oleaginosas comuns na dieta dos ruminantes contêm de 70 a 90% de AGI. Os principais AG em cereais e oleaginosas são os de 18 carbonos, (Chilliard *et al.*, 2007).

A composição de AG varia entre os óleos, mas, em geral, o alimento disponível nas rações de vacas leiteiras inclui alta proporção de AGI e baixa proporção de AGS. O óleo de palma é comumente consumido como sais de cálcio de AG na nutrição de ruminantes e é rico em ω -9, o óleo de soja e o óleo de girassol são ricos em ω -6 e, os óleos de linhaça e peixe, ricos em ω -3.

Diversos estudos abordaram o potencial dos AGPIs na dieta de vacas leiteiras, através de gorduras protegidas e proteção natural dos grãos na dieta, mostrando melhoras na reprodução como os estudos com: linhaça ou girassol em grão - Ambrose *et al.* (2006); óleo de linhaça ou girassol encapsulados, Zachut *et al.* (2010); óleo de peixe encapsulado - Moallem *et al.* (2013); Elis *et al.* (2016); Freret *et al.* (2019); sais de AGs (Megalac) (Fouladi-Nashta *et al.*, 2007). As rações para ruminantes incluem mistura de óleos de variedade de alimentos e a combinação desses óleos determina a relação final ω -6: ω -3 na dieta.

1.9 Fisiologia reprodutiva da fêmea bovina

A fêmea bovina é caracterizada como poliéstrica não sazonal, apresentando ciclos estrais com intervalos regulares médios de 21 dias, regulados por mecanismos endócrinos

e neuroendócrinos que envolvem a interação dos hormônios hipotalâmicos, hipofisários e ovarianos. Em condições normais, o ciclo divide-se em duas fases: a fase folicular e a fase luteínica (Soares; Junqueira, 2019).

A fase folicular ou estrogênica corresponde ao pró-estro, período de aproximadamente três dias que ocorre o desenvolvimento folicular, e ao estro que se refere a receptividade sexual, caracterizado por uma fase de curta duração, de 12 a 18 horas. A fase luteínica ou progesterônica representa o metaestro, com intervalo de três a quatro dias, em que ocorre a ovulação e formação do CL, e o diestro, período aproximado de 14 dias e caracterizado pela atividade do CL e secreção de P4, finalizando com a regressão do CL (Furtado *et al.*, 2011; Soares; Junqueira, 2019).

O desenvolvimento folicular baseia-se na existência de três ondas foliculares, a emergência da primeira onda folicular ocorre no dia da ovulação, considerado o dia 0 (D0), em animais com ciclos de duas ondas a segunda ocorre no D9 ou D10, e em animais com ciclos de três, a terceira onda emerge no D15 ou D16 (Soares; Junqueira, 2019).

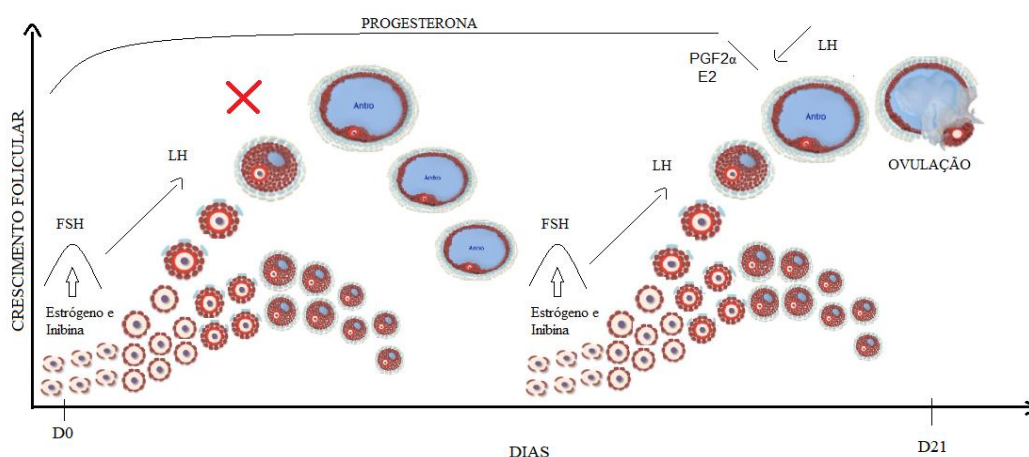
As ondas compreendem o recrutamento e o crescimento de um grupo de pequenos folículos antrais, seguido de seleção e ovulação de um folículo dominante e a regressão dos folículos subordinados. As gonadotrofinas hipofisárias, Hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) interferem na manutenção e manifestação destes eventos (Mello *et al.*, 2014). O aumento das concentrações plasmáticas de FSH estimula o recrutamento de mais de 20 folículos com diâmetro médio de três mm, proporcionando o crescimento e desenvolvimento dos folículos referente ao dia 0 (D0) da ovulação (Soares; Junqueira, 2019).

No estágio de seleção a concentração de FSH atinge níveis basais máximos, permitindo que o folículo selecionado exerça dominância sobre os demais, inibindo o crescimento e o recrutamento de novos folículos (Mello *et al.*, 2014). Nesse estágio ocorre um processo denominado de divergência, que tem como característica a baixa concentração sérica de FSH, em decorrência da elevada produção de E2 e inibina pelo folículo de maior diâmetro. As altas concentrações de E2 aumentam o número de receptores de LH, possibilitando o pico pré-ovulatório (Soares; Junqueira, 2019).

Quando o folículo dominante atinge seu diâmetro máximo no meio do ciclo estral os níveis basais de P4 encontram-se altos, impedindo a ovulação e ocasionando a atresia folicular (Mello *et al.*, 2014), além de ser regulada por fatores endócrinos, como FSH,

LH, fatores parácrinos como oIGF-1 e ativina (Araújo *et al.*, 2010). Portanto, a atresia folicular está associada à insuficiência de receptores gonadotróficos, que por sua vez realiza mudanças morfológicas, bioquímicas e histológicas causando a degeneração folicular (Soares; Junqueira, 2019). Dessa forma, inicia-se uma nova onda de folículos recrutados, de modo que o folículo dominante que se desenvolve na última onda de cada ciclo torne-se o folículo ovulatório (Figura 1) (Mello *et al.*, 2014).

Figura 1. Desenvolvimento folicular com duas ondas de crescimento.



Fonte: elaborado pela autora.

Após a ovulação ocorre a formação do CL, cuja principal função é a síntese de P4, essencial para a manutenção da gestação. Todavia, quando não ocorre a fertilização ou o conceito não possui capacidade de sinalizar sua existência, isto é, impedir o endométrio de liberar $\text{PGF}_2\alpha$ e a posterior regressão do CL. Essa sinalização está relacionada com a produção de interferon (IFN tau) pelo embrião, que regula a expressão de genes, diminuindo a síntese de receptores para ocitocina no endométrio e posterior secreção de $\text{PGF}_2\alpha$, preservando a vida fetal.

1.10 Função lipídica nas fases do ciclo estral

Os lipídios desempenham uma função essencial na composição e organização das células, participam ativamente das alterações oocitárias durante o seu desenvolvimento (Bou Khalil *et al.*, 2010). Essa participação é observada pelo crescimento do número de

gotículas lipídicas quando se estabelece a dominância folicular e pela deposição contínua de lipídios no momento da maturação final (Hyttel, 1997).

Em destaque tem o ω -3 que são estimuladores endógenos de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma. Esses receptores regulam os hormônios sexuais esteroides envolvidos nos processos de crescimento e diferenciação dos folículos ovarianos, maturação do oócito e desenvolvimento do embrião (Aparicio *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2017; Nuttinck *et al.*, 2017).

1.10.1 Fase do recrutamento

Nessa fase os folículos primários que estão em quiescência são recrutados sob o estímulo do FSH, esses por sua vez estimulam o crescimento dos folículos. A quantidade de folículos recrutados varia de animal para animal, porém, os níveis circulantes do fator de crescimento IGF-1 e insulinas livres aumentam a sensibilidade das células da granulosa ao FSH, favorecendo esse recrutamento (Landau *et al.*, 2000; Armstrong *et al.*, 2002). Os folículos primários iniciam a formação da zona pelúcida (ZP) uma película que envolve o oócito e o protege, sendo formada por três glicoproteínas (ZP1, ZP2 e ZP3) a partir de secreções do próprio oócito e por células foliculares do ovário (Huntriss *et al.*, 2002).

1.10.2 Fase da divergência

O crescimento dos folículos antrais, na seleção folicular, é dependente dos níveis de FSH. Quando há aumento da concentração os folículos responsivos continuam seu crescimento, desenvolvem e produzem quantidades crescentes de E2 (Mello *et al.*, 2014). Nessa fase o potencial da ação dos lipídios inicia-se a partir da formação das células da granulosa, já na fase de folículo primário multifuncional, e de maior potencial na fase do folículo antral, é formado o antro, cavidade preenchida pelo fluído folicular (Hennet; Combelles, 2012). Fluído que banha o oócito e faz mediação entre os vários tipos celulares presentes no folículo (Revelli *et al.*, 2009). Este fluído é formado a partir da corrente sanguínea e da secreção das células somáticas no interior do folículo que contém

grande variedade de moléculas, que além dos lipídios possuem proteínas, hormônios e fatores de crescimento (Revelli *et al.*, 2009).

Sendo assim, sua composição é excelente indicador da qualidade oocitária e embrionária, pois nele é refletido todo o metabolismo folicular, contém moléculas reguladoras que são cruciais para o sucesso do desenvolvimento oocitária (Wallace *et al.*, 2012). Essas variedades de moléculas, inclusive os lipídios, influenciam a retomada da maturação meiótica do oócito (passagem da prófase I para a metáfase II) estimulando a ovulação rompendo o folículo para a liberação do oócito (Hennet; Combeles, 2012).

1.10.3 Fase da dominância

Os oócitos armazenam lipídios neutros, TAG e ésteres de colesterol em gotículas citoplasmáticas desde o estágio de folículo secundário. É sabido que o número de gotículas lipídicas aumenta à medida que o oócito cresce (Fair *et al.*, 1997). Nessa fase o folículo selecionado passa a sobressair e crescer até ocorrer a ovulação (folículo maduro), por causa dos metabolitos presentes no fluído folicular que se acumulam dentro do oócito e fornecem componentes celulares necessários para a diferenciação oocitária, entre esses metabolitos, lipídios, aminoácidos, nucleotídeos e outras pequenas moléculas estão presentes, os quais são oriundas tanto do soro quanto da atividade metabólica das células somáticas foliculares (Sturmey *et al.*, 2009; Dunning *et al.*, 2014).

Os oócitos absorvem lipídios exógenos, mas sintetizam e armazenam lipídios endógenos no ooplasma (Cetica *et al.*, 2002; Auclair *et al.*, 2013). Da mesma forma, ao longo do desenvolvimento do embrião os blastômeros têm a capacidade de usar reservas lipídicas exógenas e/ou endógenas para servir como fonte de energia necessária para o desenvolvimento embrionário inicial.

Durante o crescimento e a maturação oocitaria os lipídios do fluído folicular acumulam dentro do oócito e constituem uma reserva para o desenvolvimento embrionário futuro (Haggarty *et al.*, 2006). A lipogênese, lipólise, transporte e oxidação de AGs ocorrem em gametas e células embrionárias de todas as espécies de mamíferos, como componente intrínseco do metabolismo energético. Em oócitos e células do cumulus, a degradação de lipídios é responsável pela produção de ATP,

essencial para os processos metabólicos que levam à maturação oocitária em condições de cultivo *in vivo* e *in vitro* (Cummins, 2004).

Portanto, os lipídios participam ativamente das alterações dos oócitos durante seu desenvolvimento através do acúmulo de gotículas lipídicas no interior do citoplasma celular, quando a dominância folicular é estabelecida e pela contínua deposição lipídica até o período final da maturação (Hyttel, 1997).

1.11 Ovum *pick-up* - opu

Na recuperação oocitária pela Ovum *pick up* (OPU) não se faz necessária a utilização de estímulos hormonais, fato que possibilita maior vida útil reprodutiva das doadoras e redução no intervalo de produção dos embriões (Mello *et al.*, 2016). Estudos apontam que o procedimento de aspiração folicular pode ser realizado em dias aleatórios do ciclo estral, todavia existem fatores negativos referentes à competência oocitária que precisam ser minimizados, buscando melhorar as taxas embrionárias e minimizar as percas.

Por esse motivo, pesquisas mostram que as aspirações foliculares realizadas nos estágios iniciais da emergência folicular, até 5 dias após a emergência, ou próximas de 3 a 4 dias após o estro, resultam em melhores taxas de recuperação oocitária, decorrentes da ausência de eventos atrésicos (Gimenes *et al.*, 2015; Cavaliere *et al.*, 2018).

Dessa maneira, promover estímulos gonadotróficos pré-procedimento de OPU, como protocolos de sincronização da onda folicular pode aumentar a quantidade de folículos visualizados no ultrassom e melhorar a qualidade dos oócitos recuperados para a PIVE.

1.12 Sincronização da onda folicular

Existem diversos fatores que interferem nos resultados da OPU e da PIVE, como o diâmetro folicular, qualidade do oócito, a fase da onda folicular, o grupo genético e a categoria animal (Gimenes *et al.*, 2015). Esses diversos fatores influenciam direta ou

indiretamente na eficácia da maturação, da fertilização e da cultura embrionária (Gusmão *et al.*, 2017).

Conforme descrito anteriormente, no decorrer da dinâmica folicular é possível identificar o desenvolvimento de duas ou até de três ondas foliculares e, ao longo de cada onda folicular existem folículos dominantes e subordinados, os quais podem estar em fase de crescimento, dominância, estática ou de regressão (Gimenes *et al.*, 2015).

Na aspiração folicular um folículo que possui grande relevância é o antral, visto que a competência do oócito continua a aumentar à medida que o tamanho do folículo cresce e aproxima-se da ovulação. Portanto, o diâmetro do folículo ovariano no momento da sessão de OPU é um dos critérios mais importantes usados para melhorar a eficácia dos sistemas de PIVE (Gusmão *et al.*, 2017).

Dessa maneira, estudos relataram que o número e a qualidade do *complexo cumulus oócito* (COCs) recuperados pela OPU, a clivagem e a taxa de blastocistos dependem, em grande parte, do estágio da onda folicular em que os animais estão no momento da aspiração folicular (Gimenes *et al.*, 2015; Cavalieri *et al.*, 2018).

1.13 Ácidos graxos na produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE)

A PIVE bovinos é globalmente aplicada, responde pela maior taxa dos embriões produzidos não apenas em raças zebuínas de corte, mas nos taurinos de corte e leite. A disponibilidade de sêmen sexado, a partir do ano de 2005, agregado a contínua melhora no rendimento da PIVE, conduziram sua aceitação em raças leiteiras (Viana, 2022). Em 2017, pela primeira vez nos registros da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS), o total de embriões de PIV ultrapassou aqueles gerados *in vivo* (992.289 vs 406.287, respectivamente), o Brasil é referência no uso dessa biotecnologia, respondendo por 34,8% da produção global (Viana, 2022).

A PIVE consiste em três etapas fundamentais: a maturação *in vitro* (MIV) - etapa em que os oócitos sofrem diversas mudanças nucleares e citoplasmáticas para tornar maturo, apto para a fecundação e competente para suportar o desenvolvimento embrionário (Gordon, 2003); a fecundação *in vitro* (FIV) - técnica laboratorial que permite a união entre os gametas femininos e masculinos para a formação do zigoto,

sendo que os mesmos são incubados conjuntamente em meio propício para a capacitação espermática e fecundação (Machaty *et al.*, 2012); e o cultivo *in vitro* (CIV) - em que ocorre as diversas divisões mitóticas das células zigóticas até que atinja a fase de mórula e blastocisto.

Os processos da PIVE podem ser realizados com ou sem atmosfera completamente definida. O sistema não definido utiliza 5% de CO₂ em ar atmosférico (aproximadamente 20% de O₂ concentrações), tendo menor custo em comparação com os sistemas definidos que utilizam 100% de mistura gasosa (5% CO₂, 5% de O₂ balanceado com N₂) com baixa tensão de oxigênio (Sovernigo *et al.*, 2017).

A maturação citoplasmática e nuclear dos COCs é um passo extremamente importante na tecnologia reprodutiva para o sucesso da fertilização e desenvolvimento do embrião. Alguns estudos relataram a importância não só para a produção de embriões, mas para tolerar a criopreservação que preserva oócitos por várias aplicações biotecnológicas (Balasubramanian; Rho, 2007; Lonergan; Fair, 2016).

Durante a CIV ocorrem diversas divisões mitóticas das células zigóticas até que atinja a fase de mórula. Adiante, inicia a formação do blastocisto em que as células diferenciam-se formando a massa celular interna (MCI), que originará o feto, o trofotoderma que darão origem aos anexos embrionários e a cavidade chamada blastocele levando 7 a 8 dias para alcançar o estágio de blastocisto expandido (Gordon, 2003).

Os TAGs são os lipídios predominantes nos grânulos lipídicos dos oócitos e embriões (Sturmeijer *et al.*, 2009). São sintetizados pela ação da enzima diacilglicerol aciltransferase 2 (DGAT2) e concentram-se dentro de gotas lipídicas citoplasmáticas, que ficam rodeadas por proteínas (“*PAT proteins*”). Entre essas está a perilipina 2 (PLIN2), proteína que foi encontrada nas gotas lipídicas de oócitos murinos (Yang *et al.*, 2010) e bovinos (Aardema *et al.*, 2011). Ambas as proteínas, tanto a DGAT2 quanto a PLIN2 associam-se ao acúmulo lipídico, pois são responsáveis pela síntese dos TAG e gotas lipídicas e estão relacionadas com a entrada de TAG nas gotas e, em consequência, com o tamanho das mesmas (Bickel *et al.*, 2009).

O efeito da adição de AGs na maturação oocitária e meios de cultura depende do tipo e concentração de AG para a qual oócitos são expostos (Aardema *et al.*, 2011), pois os lipídios têm papéis importantes no metabolismo energético na maturação oocitária

(Sturmeijer *et al.*, 2009). Desta maneira, o soro fetal bovino (SFB) ocasiona maiores taxas de embriões na PIVE, por isso é um suplemento proteico mais utilizado nos meios de produção. Além disso, alguns fatores de crescimento ajudam na expansão das células do *cumulus* mesmo na ausência do FSH (Abe; Hoshi, 2003).

É importante ressaltar que todas as organelas existentes no citoplasma celular sofrem modificações ao longo da maturação. Os grânulos corticais são vesículas sintetizadas a partir do aparelho de Golgi, formadas por diversas proteínas, enzimas, glicosaminoglicanos e moléculas que são liberadas durante a fusão dos gametas para o enrijecimento da ZP, tendo como função evitar a polispermia (Wong; Wessel, 2006).

Uma das organelas mais importantes para o metabolismo embrionário inicial é a mitocôndria que possui origem materna e é responsável pela produção de ATP na célula a partir da β -oxidação dos AGs para suporte energético. Mediante a fosforilação oxidativa e durante a clivagem, as mitocôndrias distribuem-se de forma aleatória e um déficit de ATP pode ter como consequência a disfunção e fragmentação celular, comprometendo o desenvolvimento do blastocisto (Cummins, 2004).

A ineficiência da β -oxidação, no entanto, causa disfunção da mitocôndria e promove geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), causando danos no DNA. Foi mostrado que a geração excessiva de ERO modula a função mitocondrial por perturbar a β -oxidação, levando ao aumento da acumulação de lipídios (Van Hoeck *et al.*, 2015). Em suínos há relatos do aumento dessa atividade mitocondrial durante o desenvolvimento embrionário (Romek *et al.*, 2011). Estudos em bovinos também indicam a reorganização e atividade mitocondrial que interferem na maturação citoplasmática e reativação meiótica oocitária e no desenvolvimento após a fecundação (Stojkovic *et al.*, 2001).

Van Blerkom (2011) afirma que o desequilíbrio entre fornecimento e demanda de ATP causado pelo número insuficiente de mitocôndrias pode resultar em distúrbios na segregação cromossomal, falhas na maturação e fertilização, parada da divisão celular, citocinese anormal e fragmentação evidenciando que a competência oocitária está diretamente relacionada com a capacidade bioenergética citoplasmática.

Nos embriões PIV em meios suplementados com SFB cerca de 70% das mitocôndrias apresentam características de imaturidade como cristas periféricas e formato circular, contra aproximadamente 10% em embriões cultivados em meios livres de SFB (Abe *et al.*, 2002). Quando apenas 30% da competência mitocondrial está em

atividade, a β -oxidação dos AGs torna-se desequilibrada e resultando em aumento do acúmulo de lipídios (Crosier *et al.*, 2001).

A carnitina é uma amina quaternária sintetizada predominantemente no fígado a partir dos aminoácidos lisina e metionina (Mishra *et al.*, 2016), um cofator essencial necessário para o transporte de AGs de cadeia longa, para dentro da matriz mitocondrial para a geração de energia (Dunning *et al.*, 2014). Além disso, a carnitina foi identificada como um antioxidante com capacidade de neutralizar os radicais livres derivados do oxigênio (ROS), especialmente o ânion superóxido. Além do mais, a suplementação de meios de cultura com L-carnitina para promover o metabolismo lipídico durante a maturação oocitária *in vitro* e o desenvolvimento embrionário inicial, leva a qualidade melhorada do embrião.

Khan *et al.* (2021) revisaram de forma abrangente e concisa e descreveram o papel do metabolismo lipídico na qualidade e maturação do oócito, e concluíram que as gotículas lipídicas são moléculas ativas que desempenham papel importante no metabolismo lipídico. Geralmente essas gotículas lipídicas consistem em lipídios neutros, principalmente os TAG e éster de colesterol e oferecem substratos para produção de energia, sinalização de lipídios e componentes de membrana. Normalmente as gotículas lipídicas são armazenadas no citoplasma durante a oogênese dos mamíferos, embora por razões desconhecidas, o conteúdo exato das gotículas lipídicas varia amplamente entre as espécies.

Assim, é necessária uma quantidade equilibrada de várias concentrações de AGs para o crescimento e desenvolvimento ideais dos oócitos. Curiosamente a maior concentração de AGS afeta até mesmo a competência de desenvolvimento pós-fertilização de oócitos maturados *in vitro*, enquanto AGI como o ácido oleico iniciam a competência de desenvolvimento normal. Os efeitos adversos dos AGS podem ser revertidos pela adição de uma quantidade equilibrada de ácido oleico durante maturação *in vitro* de oócitos (Wu *et al.*, 2010; Aardema *et al.*, 2011).

Fazendo uma análise retrospectiva das investigações já realizadas com AGPI na performance reprodutiva de fêmeas bovinas, principalmente fêmeas leiteiras, a maioria prioriza os efeitos da gordura protegida. Em tais estudos, os efeitos no número de folículos aspirados, taxa de fertilização e embriões produzidos, tornam-se contraditórios e muitas vezes deferiram quando o mesmo tratamento foi comparado por diferentes

autores. Sendo assim, ainda são necessárias mais pesquisas a fim de avaliar os efeitos da inclusão de canola em grão (fonte protegida) na dieta de novilhas da raça Holandês sobre a OPU e a produção *in vitro* de embriões.

Referências

- Aardema, H., Vos, P.L.A.M., Lolicato, F., Roelen, B.A.J., Knijn, H.M., Vaandrager, A.B., Helms, J.B., Gadella, B.M., 2011. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. *Biology of Reproduction*. 85, 62-69. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088815>.
- Abe, H., Hoshi, H., 2003. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *Journal of Reproduction and Development*. 49 (3),193–202. <https://doi.org/10.1262/jrd.49.193>.
- Abe, H., Matsuzaki, S., Hoshi, H., 2002. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. *Theriogenology*. 57, 1273–1283. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00634-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00634-9).
- Albuquerque, K.P., Prado, I.N. do, Cavalieri, F.L.B., Rigolon, L.P., Prado, R.M. do, Rotta, P.P., 2009. Fatty acid composition in blood plasma and follicular liquid in cows supplemented with linseed or canola grains. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 22 (9), 1248-1255. <https://doi.org/10.5713/ajas.2009.80568>.
- Allen, M.S., 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 83 (7), 1598-1630. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75030-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75030-2)
- Alves, J.P.M., Fernandes, C.C.L., Calderón, C.E.M., Rossetto, R., Bertolini, M., Rondina, D., 2021. Short-term supplementation of diets rich in lipids or glycogen precursors can affect intra follicular environment, oocyte mitochondrial gene expression, and embryo development following parthenogenesis in goat. *Small Ruminant Research*. 194, 106-279. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106279>.
- Ambrose, D.J., Kastelic, J.P., Corbett, R., Pitney, P.A., Petit, H.V., Small, J.A., Zalkovic, P., 2006. Lower Pregnancy Losses in Lactating Dairy Cows Fed a Diet Enriched in α -Linolenic Acid. *Journal of Dairy Science*. 89 (8), 3066-3074. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72581-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72581-4).
- Aparicio, I.M., Garcia-Herreros, M., O’Shea, L.C., Hensey, C., Lonergan, P., Fair, T., 2011. Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. *Biology. Reproduction*. 84 (5), 910-921. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087411>.
- Araújo, V.R., Almeida, A.P., Magalhães, D.M., Matos, M.H.T., Tavares, L.M.T., Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R., 2010. Papel das Proteínas Morfogenéticas Ósseas-6 e-7 (BMP-6 e-7)

- na regulação da foliculogênese inicial em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 34,69–78.
- Armstrong, D.G., Gong, J.G., Gardner, J.O., Baxter, G., Hogg, C.O., Webb, R. 2002. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction*. 123 (3) 371-378.
- Armstrong, D.G., Gong, J.G., Webb, R., 2003. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reproduction*. 61, 403-414.
- Armstrong, D.G., Mcevoy, T.A.G., Baxter, G., Robinson, J.J., Hogg, C.O., Woad, K.J., Webb, R. 2001. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biology Reproduction*. 64 (6), 1624-1632.
- Auclair, S., Uzbekov, R., Elis, S., Sanchez, L., Kireev, I., Lardic, L., Dalbies-Tran, R. Uzbekova, S., 2013. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. *American Journal of Physiological Endocrinological Metabolism*. 304 (6), 599-613. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00469.2012>.
- Balasubramanian, S., Rho, G.-J., 2007. Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. *Animal Reproduction Science*. 98 (3-4), 282-292. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.011>.
- Bender, K., Walsh, S., Evans, A.C.O., Fair, T., Brennan, L., 2010. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. *Reproduction* 139, 1047–1055. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0068>.
- Berg, J.M., Stryer, L., and Tymoczko, J. 2004. Bioquímica, in: *Bioquímica*. Guanabara Koogan S.A., pp.43–118.
- Bertol, T.M., Mazzuco, H., 1999. Farelo de canola: uma alternativa protéica para alimentação de suínos e aves.
- Bett, V., Santos, G.T. dos, Aroeira, L.J.M., Petit, H.V., Dias, P.G., Leggi, T.C. dos S.S., Peron, K. de F., Zeoula, L.M., 1999. Desempenho e digestibilidade in vivo de cordeiros alimentados com dietas contendo canola em grão integral em diferentes formas. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 28, 808-815. <https://doi.org/10.1590/S1516-35981999000400022>.
- Bickel, P.E., Tansey, J.T., Welte, M.A., 2009. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), 419-440. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.04.002>.
- Bilby, T.R., Block, J., do Amaral, B.C., Sa Filho, O., Silvestre, F.T., Hansen, P.J., Staples,

- C.R., Thatcher, W.W., 2006. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. *Journal of Dairy Science*. 89 (10), 3891-3903. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72432-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72432-8).
- Bionaz, M., Vargas-Bello-Pérez, E., Busato, S., 2020. Advances in fatty acids nutrition in dairy cows: from gut to cells and effects on performance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11, 1-36. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00512-8>.
- Boken, S.L., Staples, C.R., Sollenberger, L.E., Jenkins, T.C., Thatcher, W.W., 2005. Effect of grazing and fat supplementation on production and reproduction of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 88 (12), 4258-4272. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73112-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73112-X).
- Bou Khalil, M., Hou, W., Zhou, H., Elisma, F., Swayne, L.A., Blanchard, A.P., Yao, Z., Bennett, S.A.L., Figeys, D., 2010. Lipidomics era: accomplishments and challenges. *Mass Spectrometry Reviews*. 29 (6), 877-929. <https://doi.org/10.1002/mas.20294>.
- Caldari-Torres, C., Lock, A.L., Staples, C.R., Badinga, L., 2011. Performance, metabolic, and endocrine responses of periparturient Holstein cows fed 3 sources of fat. *Journal of dairy science*. 94 (3), 1500-1510. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3748>.
- Cardoso, C.J.T., de Lima, A.C.B., da Silva, W.A.L., Souza-Cáceres, M.B., Pereira, D.M., de Oliveira, M.V.M., Nogueira, É., de Andrade Melo-Sterza, F., 2019. Suplementação de fêmeas girolando com linhaça: efeitos sobre contagem de folículos antrais, qualidade oocitária, parâmetros nutricionais e metabólitos plasmáticos. *Semina: Ciências Agrárias*. 40, 2637–2650. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n6p2637>.
- Cardoso, R.C., Alves, B.R.C., Williams, G.L., 2018. Neuroendocrine signaling pathways and the nutritional control of puberty in heifers. *Animal Reproduction*. 15, 868–878. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0013>.
- Carrillo-González, D.F., Hernández-Herrera, D.Y., Maldonado-Estrada, J.G., 2023. The role of L-carnitine in bovine embryo metabolism. A review of the effect of supplementation with a metabolic modulator on in vitro embryo production. *Animal Biotechnology*. 34 (2), 413–423. <https://doi.org/10.1080/10495398.2021.1938593>.
- Cavalieri, F.B., Santos, G.T., Matsushita, M., Petit, H.V., Rigolon, L.P., Silva, D., Horst, J.A., Capovilla, L.C., Ramos, F.S., 2005. Milk production and milk composition of dairy cows fed Lac100® or whole flaxseed. *Canadian Journal of Animal Science*. 85 (3), 413–416. <https://doi.org/10.4141/a04-088>.
- Cavalieri, F.L.B., Morotti, F., Seneda, M.M., Colombo, A.H.B., Andreazzi, M.A., Emanuelli, I.P., Rigolon, L.P., 2018. Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian

- follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology* 117, 57–60.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.026>.
- Cerri, R.L.A., Juchem, S.O., Chebel, R.C., Rutigliano, H.M., Bruno, R.G.S., Galvão, K.N., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P., 2009. Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 92(4), 1520-1531. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1614>.
- Cetica, P., Pintos, L., Dalvit, G., Beconi, M., 2002. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction* 124, 675–681.
- Champe, P.C., Harvey, R.A. 1994. *Biochemistry*. Philadelphia. 2, 443.
- Chavarria, G., Tomm, G.O., Muller, A., Mendonça, H.F., Mello, N., Betto, M.S., 2011. Índice de área foliar em canola cultivada sob variações de espaçamento e de densidade de semeadura. *Ciência Rural*. 41 (12), 2084-2089. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011001200008>.
- Childs, S., Carter, F., Lynch, C.O., Sreenan, J.M., Lonergan, P., Hennessy, A.A., Kenny, D.A., 2008a. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). *Theriogenology* 70, 992–1003.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.008>.
- Childs, S., Hennessy, A.A., Sreenan, J.M., Wathes, D.C., Cheng, Z., Stanton, C., Diskin, M.G., Kenny, D.A., 2008b. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. *Theriogenology* 70, 595–611.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.002>.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., Doreau, M., 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science Technology*. 109, 828–855. <https://doi.org/10.1002/ejlt.20070008>.
- Conab, 2023. Acompanhamento da safra brasileira de grãos (No. 10). Conab.
- Conab, 2018. Acompanhamento da safra brasileira de grãos (No. 5). Conab.
- Coppock, C.E., Wilks, D.L., 1991. Supplemental fat in high-energy rations for lactating cows: effects on intake, digestion, milk yield, and composition. *Journal Animal Science*. 69, 3826–3837. <https://doi.org/10.2527/1991.6993826x>.
- Costa, R.L.D.Da., Fontes, R.D.S. 2010. Ácidos graxos na nutrição e reprodução de ruminantes. *Pubvet*.4(24),873.
- Costa, L.P.M., De Lima, L.S., Damasceno, J.C., De Marchi, F.E., Granzotto, F., Dos Santos,

- F.S., Santos, A.L.D., Dos Santos, G.T., 2020. Combination of pelleting and monensin does not affect antioxidant properties and fatty acids in milk of grazing dairy cows supplemented with a concentrate containing soybean seeds. *Tropical Animal Health and Production*. 52, 573–581. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02044-4>.
- Crosier, A.E., Farin, P.W., Dykstra, M.J., Alexander, J.E., Farin, C.E., 2001. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biology of Reproduction*. 64 (5), 1375–1385. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.5.1375>.
- Cummins, J.M., 2004. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 115, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2004.01.011>.
- De Figueiredo, D.M., Paulino, M.F., Detmann, E., De Souza, M.G., Couto, V.R.M., Sales, M.F.L. 2008. Estratégias de suplementação para antecipação da idade à puberdade para novilhas de corte em pastagem tropical. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. 30 (4), 415-423.
- De Marchi, F.E., Romero, J.V., Damasceno, J.C., Grande, P.A., Zeoula, L.M., Dos Santos, G.T., 2015. Pelleting in Associated with Sodium Monensin Increases the Conjugated Linoleic Acids Concentration in the Milk of Dairy Cows Fed Canola Seeds. *Asian-australas. Journal. Animal Science*. 28 (8) ,1095–1104. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0865>.
- De Mori, C., Tomm, G.O., Ferreira, P.E.P. 2014. Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da canola no mundo e no Brasil. *Passo Fundo: Embrapa Trigo*. 36. 149.
- Domingues, M.C.N., Rigolon, L.P., Cavalieri, F.L.B., Seko, M.B., Albuquerque, K., Zancheta, C.G., 2014. Viabilidade de embriões vitrificados oriundos da fertilização in vitro de oócitos de vacas suplementadas com canola. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66, 145–151. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352014000100021>.
- Duffield, T., Bagg, R., Kelton, D., Dick, P., Wilson, J., 2003. A field study of dietary interactions with monensin on milk fat percentage in lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 86 (12), 4161–4166. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74031-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74031-4).
- Dunning, K.R., Russell, D.L., Robker, R.L., 2014. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction* 148, 15–27. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0251>.
- Elis, S., Freret, S., Desmarchais, A., Maillard, V., Cognié, J., Briant, E., Touzé, J.L., Dupont, M., Faverdin, P., Chajès, V., Uzbekova, S., Monget, P., Dupont, J., 2016. Effect of a long chain n-3 PUFA-enriched diet on production and reproduction variables in Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 164, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.020>.

- Fair, T., Hulshof, S.C., Hyttel, P., Greve, T., Boland, M., 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*. 195, 327–336. <https://doi.org/10.1007/s004290050052>.
- Farahmandfar, R., Asnaashari, M., Sayyad, R., 2015. Comparison antioxidant activity of Tarom Mahali rice bran extracted from different extraction methods and its effect on canola oil stabilization. *Journal of Food Science and Technology*. 52, 6385–6394. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1702-2>.
- Finucane, O.M., Lyons, C.L., Murphy, A.M., Reynolds, C.M., Klinger, R., Healy, N.P., Cooke, A.A., Coll, R.C., McAllan, L., Nilaweera, K.N., O'Reilly, M.E., Tierney, A.C., Morine, M.J., Alcalá-Díaz, J.F., López-Miranda, J., O'Connor, D.P., O'Neill, L.A., McGillicuddy, F.C., Roche, H.M., 2015. Monounsaturated Fatty Acid–Enriched High-Fat Diets Impede Adipose NLRP3 Inflammasome–Mediated IL-1 β Secretion and Insulin Resistance Despite Obesity. *Diabetes*. 64, 2116–2128. <https://doi.org/10.2337/db14-1098>.
- Fontes, P.L.P., Henry, D.D., Ciriaco, F.M., Oosthuizen, N., Cooke, R.F., Mercadante, V.R.G., DiLorenzo, N., Lamb, G.C., 2019. Effects of polyunsaturated fatty acids supplementation on reproductive parameters associated with the performance of suckled beef cows. *Animal* 13, 349–357. <https://doi.org/10.1017/S175173111800143X>.
- Fouladi-Nashta, A.A., Gutierrez, C.G., Gong, J.G., Garnsworthy, P.C., Webb, R., 2007. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. *Biology Reproduction*. 77, 9–17. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.058578>.
- Fouladi-Nashta, A.A., Marei, W.F.A., Wathes, D.C., 2009. Diverse effects of polyunsaturated fatty acids on oocyte maturation and development in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*. 44, 71.
- Freret, S., Osekria, M., Bourhis, D.L., Desmarchais, A., Briant, E., Desnoes, O., Dupont, M., Le Berre, L., Ghazouani, O., Bertevello, P.S., Teixeira-Gomes, A.P., Labas, V., Uzbekova, S., Salvetti, P., Maillard, V., Elis, S., 2019. Effects of a n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet on embryo production in dairy cows. *Reproduction* 158, 71–83. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0644>.
- Furtado, D.A., Tozzetti, D.S., Bastos, M.F., Dias, L.G.G.G. 2011. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. 16, 01-25.
- Gandra, J.R., Barletta, R.V., Mingoti, R.D., Verdurico, L.C., Freitas, J.E., Oliveira, L.J., Takiya, C.S., Kfoury, J.R., Wiltbank, M.C., Renno, F.P. 2016. Effects of whole flaxseed, raw

- soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 99 (6), 4590-4606.
- Garcia-Bojalil, C.M., Staples, C.R., Risco, C.A., Savio, J.D., Thatcher, W.W., 1998. Protein degradability and calcium salts of long-chain fatty acids in the diets of lactating dairy cows: productive responses. *Journal of Dairy Science*. 81 (5), 1374–1384.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75701-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75701-7).
- Gimenes, L.U., Ferraz, M.L., Fantinato-Neto, P., Chiaratti, M.R., Mesquita, L.G., Sá Filho, M.F., Meirelles, F.V., Trinca, L.A., Rennó, F.P., Watanabe, Y.F., Baruselli, P.S., 2015. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect in vitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos Taurus*, and *Bubalus bubalis*. *Theriogenology* 83 (3), 385–393.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.030>.
- Gopinger, E., Castro, M.L.S., Catalan, A.A.S., Roll, V.F.B., n.d. Composição bromatológica do peito de frangos de corte alimentados com farelo de canola. *Anais do Salão Internacional*. 5 (4),1.
- Goes, R.H.T.B., Silva, L.H.X., Souza, K.A. 2013. Alimentos e alimentação animal. Editora da Universidade Federal da Grande Dourados.
- Gordon, I., 2003. Laboratory Production of Cattle Embryos. CABI. Hafez, E.S.E., Hafez, B., 2004. Reprodução Animal.
- Grummer, R.R., Carroll, D.J. 1991. Effects of dietary fat on metabolic disorders and Reproductive performance of dairy cattle. *Journal Animal Science*. 69 (9), 3838-3852.
- Gusmão, A.O.M., Silva, A.R., Medeiros, M.O. 2017. A biotecnologia e os avanços da sociedade. *Biodiversidade*. 16, 135-154.
- Hafez, E.S.E., Hafez, B. 2004. Reprodução animal. 7, 513.
- Haggarty, P., Wood, M., Ferguson, E., Hoad, G., Srikantharajah, A., Milne, E., Hamilton, M., Bhattacharya, S., 2006. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Human Reproduction*. 21 (3), 766–773. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei385>.
- Harvatine, K.J., Allen, M.S. 2004. Kinetic model of rumen biohydrogenation: fractional rates of fatty acid biohydrogenation and passage. *Journal of Animal and Feed Science*. 13, 87-90.
- Hell, R.W., Wyse, G.Q., Anderson, M. 2012. Fisiologia Animal. *Artemed*. 5, 114-120.
- Hennet, M.L., Combelles, C.M.H., 2012. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*. 56 (12), 819–831.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.120133cc>

- Hentz, F. 2010. Avaliação da inclusão do farelo de canola em dietas para ruminantes. 57 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. <http://repositorio.ufsm.br/handle/1/10756>
- Hightshoe, R.B., Cochran, R.C., Corah, L.R., Harmon, D.L., Vanzant, E.S., 1991. Influence of source and level of ruminal-escape lipid in supplements on forage intake, digestibility, digesta flow, and fermentation characteristics in beef cattle. *Journal Animal Science*. 69 (12), 4974–4982. <https://doi.org/10.2527/1991.69124974x>.
- Humer, E., Petri, R.M., Aschenbach, J.R., Bradford, B.J., Penner, G.B., Tafaj, M., Südekum, K.-H., Zebeli, Q., 2018. Invited review: Practical feeding management recommendations to mitigate the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 101 (2), 872–888. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13191>.
- Huntriss, J., Gosden, R., Hinkins, M., Oliver, B., Miller, D., Rutherford, A.J., Picton, H.M., 2002. Isolation, characterization and expression of the human Factor In the Germline alpha (FIGLA) gene in ovarian follicles and oocytes. *Molecular Human Reproduction*. 8 (12), 1087–1095. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.12.1087>.
- Hwang, S.-F., Hwang, S.F., Ahmed, H., Zhou, Q., Turnbull, G.D., Strelkov, S.E., 1999. Canola Council of Canada. albertacanola.com. CANOLA
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T., 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47, 23–32. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00336-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00336-6).
- Jenkins, T.C., 1993. Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*. 76 (12), 3851–3863. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77727-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77727-9).
- Khajeh, M., Rahbarghazi, R., Nouri, M., Darabi, M., 2017. Potential role of polyunsaturated fatty acids, with particular regard to the signaling pathways of arachidonic acid and its derivatives in the process of maturation of the oocytes: Contemporary review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 94, 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.140>.
- Khan, R., Jiang, X., Hameed, U., Shi, Q., 2021. Role of Lipid Metabolism and Signaling in Mammalian Oocyte Maturation, Quality, and Acquisition of Competence. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9, 639–704. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.639704>.
- Kim, J.Y., Kinoshita, M., Ohnishi, M., Fukui, Y., 2001. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* 122, 131–138.
- Lamb, C., 2003. Entendendo os efeitos da nutrição na reprodução de vacas de corte, in: *Curso Novos Enfoques Na Produção E Reprodução de Bovinos*. Presented at the Curso Novos

- Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos, UNESP, pp. 139–151.
- Landau, D., Segev, Y., Eshet, R., Flyvbjerg, A., Phillip, M., 2000. Changes in the growth hormone-IGF-I axis in non-obese diabetic mice. *International journal of experimental diabetes research*. 1,9-18. <https://doi.org/10.1155/edr.2000.9>.
- Leggi, T.C., Santos, G.T., Furlan, A.C., Sakaguti, S.E., Ribas, P.N., Mira, T.R., Veiga, R.D., Bett, V., 1998. Utilização do farelo de canola (*Brassica napus*) na alimentação de vacas leiteiras. *Revista Brasileira de Zootecnia* 27, 770–776.
- Leroy, J.L.M.R., Vanholder, T., Van Kneysel, A.T.M., Garcia-Ispuerto, I., Bols, P.E.J., 2008. Nutrient prioritization in dairy cows early postpartum: mismatch between metabolism and fertility? *Reproduction Domestic. Animal*. 43 (2), 96–103. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01148.x>.
- Liu, W., Xin, Q., Wang, X., Wang, S., Wang, H., Zhang, W., Yang, Y., Zhang, Y., Zhang, Z., Wang, C., Xu, Y., Duan, E., Xia, G., 2017. Estrogen receptors in granulosa cells govern meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes in mammals. *Cell death & disease*. 8 (3), 26-62. . <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.82>.
- Loneragan, P., Fair, T., 2016. Maturation of Oocytes in Vitro. *Revista Animal Bioscience*. 4, 255–268. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110822>.
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E., Wallace, R.J., 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* 4 (7), 1008–1023. <https://doi.org/10.1017/S175173111000042X>.
- Lovatto, F.S., 2016. Valor nutricional do farelo de canola com adição de complexo multienzimático para leitões (15 30 kg). 51 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Tecnológica Federal do Paraná
- Machaty, Z., Peippo, J., Peter, A., 2012. Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. *Theriogenology* 78 (5), 937–950. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.003>.
- Mattos, R., Staples, C.R., Thatcher, W.W., 2000. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Reviews in Reproduction*. 5, 38–45. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0050038>.
- Mello, R.R.C., Ferreira, J.E., Mello, M.R.B., Palhano, H.B., 2014. Aspectos da dinâmica folicular em bovinos. *Agropecuária No Semiárido* 10 (4), 01–06. <https://doi.org/10.30969/acsa.v10i4.570>.
- Mello, R.R.C., Ferreira, J.E., Sousa, S.L.G., Mello, M., Palhano, H.B., 2016. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 40 (2),58-64.

- Micunski, V.C., Nogueira, C.E.C., Azevedo, R.L., Vanzella, E., Arnauts, G., Cabral, A.C., 2014. A Cultura Energética - Canola (*Brassica Napus L.*). *Acta Iguazu*. 3 (2), 141–149. <https://doi.org/10.48075/actaiguaz.v3i2.10624>.
- Mishra, A., Reddy, I.J., Gupta, P.S.P., Mondal, S., 2016. L-carnitine mediated reduction in oxidative stress and alteration in transcript level of antioxidant enzymes in sheep embryos produced in vitro. *Reproduction Domestic Animal*. 51 (2), 311–321. <https://doi.org/10.1111/rda.12682>.
- Moallem, U., 2018. Invited review: Roles of dietary n-3 fatty acids in performance, milk fat composition, and reproductive and immune systems in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 101 (10), 8641–8661. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14772>.
- Moallem, U., Shafran, A., Zachut, M., Dekel, I., Portnick, Y., Arieli, A., 2013. Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil improved folliculogenesis and IVF performance in dairy cows, similar to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil. *Reproduction* 146 (6), 603–614. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0244>.
- Moussavi, A.R.H., Gilbert, R.O., Overton, T.R., Bauman, D.E., Butler, W.R., 2007. Effects of feeding fish meal and n-3 fatty acids on ovarian and uterine responses in early lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 90, 145–154. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(07\)72616-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(07)72616-4).
- Muller, M., Prado, I.N., Lobo Júnior, A.R., Silva, R.R., Capovilla, L.C.T., Rigolon, L.P., Cavalieri, F.L.B., Marques, J.A., 2009. w-3 E w-9 sobre o desempenho, resposta superovulatória e produção de embriões em nelore. *Archivos de Zootecnia*. 58 (222), 241–252.
- Murray, R.K., Bender, D.A., Botham, K.M., Kennelly, P.J., Rodwell, V.W., Weil, P.A. (2006). Cholesterol Synthesis, Transport & Excretion. *harper's biochemistry*, 24, 271-283.
- Neves, C.A., dos Santos, W.B.R., Santos, G.T.D., da Silva, D.C., Jobim, C.C., Santos, F.S., Visentainer, J.V., Petit, H.V., 2009. Production performance and milk composition of dairy cows fed extruded canola seeds treated with or without lignosulfonate. *Animal Feed Science and Technol*. 154 (1-2), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.08.002>.
- Nogueira, É., Silva, A.S. da, Amaral, T.B., Ítavo, L.C.V., Dias, A.M., Mingoti, G.Z., 2012. Follicular dynamics and production of oocytes in young Nelore heifers with energetic supplementation. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 41 (9), 2012–2017. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000900007>.

- Nosheen, A., Bano, A., Ullah, F. 2011. Nutritive value of canola (*Brassica napus* L.) as affected by plant growth promoting rhizobacteria. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 113 (11), 1342-1346.
- Nuttinck, F., Jouneau, A., Charpigny, G., Hue, I., Richard, C., Adenot, P., Ruffini, S., Laffont, L., Chebrout, M., Duranthon, V., Guienne, B.M.-L., 2017. Prosurvival effect of cumulus prostaglandin G/H synthase 2/prostaglandin2 signaling on bovine blastocyst: impact on in vivo posthatching development. *Biology Reproduction*. 96 (3), 531–541. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.145367>.
- Oldick, B.S., Staples, C.R., Thatcher, W.W., Gyawu, P., 1997. Abomasal infusion of glucose and fat-effect on digestion, production, and ovarian and uterine functions of cows. *Journal Dairy Science*. 80 (7), 1315–1328. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(97\)76060-0](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(97)76060-0).
- Oliveira, R.T.D. 2017. Grãos de oleaginosas inteiros na alimentação de bovinos em confinamento. <http://repositorio.ufgd.edu.br/jspui/handle/prefix/3205>.
- Oliveira, S.G., Simas, J.M.C., Santos, F.A.P. 2004. Principais aspectos relacionados às alterações no perfil de ácidos graxos na gordura do leite de ruminantes. *Archives of Veterinary Science*. 9, 73-80.
- Paiva, V.R., Lana, R.P., Oliveira, A.S., Leão, M.I., Teixeira, R.M.A. 2013. Teores proteicos em dietas para vacas Holandesas leiteiras em confinamento. *Arquivo Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 65 (4), 1183-1191.
- Palmquist, D.L., Mattos, W.R.S. 2006. Metabolismo de lipídeos. In: Berchielli, T.T., Pires, A.V., Oliveira, S.G. *Nutrição de ruminantes*. 1, 287-310.
- Perry, G.A. 2016. Factors affecting puberty in replacement beef heifers. *Theriogenology*. 86, 373-378.
- Pena, S.M., Carvalho, T.A., Rocha-Júnior, C.M. da. 2010. Farelo de canola na alimentação de suínos e aves. *Revista Eletrônica Nutritime*. 7 (3), 1254-1268.
- Petit, H.V., Cavalieri, F.B., Dos Santos, G.T., Morgan, J., Sharpe, P. 2008. Quality of embryos produced from dairy cows fed whole flaxseed and the success of embryo transfer. *Journal of Dairy Science*. 91 (5), 1786-1790.
- Petit, H.V., Dewhurst, J.G., Proulx, J.G., Khalid, M., Haresign, W. 1998. Milk yield and reproduction of dairy cows fed saturated or unsaturated fat. *Journal Dairy Science*. 81, 302.
- Petit, H.V. 2002. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed whole flaxseed. *Journal Dairy Science*. 85 (6), 1482-1490.
- Pesce, D.M.C. 2008. Efeito da dieta contendo caroço de algodão no desempenho, características quantitativas da carcaça e qualitativas da carne de novilhos Nelore confinados.

- Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga. <https://doi.org/10.11606/T.74.2008.tde-29042008-100717>.
- Ponter, A.A., Guyader-Joly, C., Nuttinck, F., Grimard, B., Humblot, P. 2012. Oocyte and embryo production and quality after OPU-IVF in dairy heifers given diets varying in their n-6/n-3 fatty acid ratio. *Theriogenology*. 78 (3), 632-645.
- Pugliesi, G., Nishimura, T.K., Melo, G.D., Membrive, C.M.B., Naves, J.R. 2017. Regressão Espontânea do corpo lúteo em bovinos: revisão. *ARS Veterinária*. 33, 001-012.
- Raes, K., De Smet, S., Demeyer, D. 2004. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 113 (1-4), 199-221.
- Revelli, A., Piane, L.D., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., Rinaudo, P. 2009. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*. 7 (40), 4330-4337.
- Robinson, J.J., Ashworth, C.J., Rooke, J.A., Mitchell, L.M., Mcevoy, T.G. 2006. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Animal Feed Science and Technology*. 126 (3-4), 259-276.
- Robinson, R.S., Pushpakumara, P.G.A., Cheng, Z., Peters, A.R., Abayasekara, D.R.E., Wathes, D.C. 2002. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction*. 124, 119-131.
- Romek, M., Gajda, B., Rolka, M., Smorag, Z. 2011. Mitochondrial activity and morphology in developing porcine oocytes and pre-implantation non-cultured and cultured embryos. *Reproduction Domestic. Animal*. 46 (3), 471-480.
- Ruas, J.R.M., Torres, C.A.A., Borges, L.E., Marcatti-Neto, A., Silva-Filho, J.M., Santos, M.D., Carvalho, G. 2000. Concentrações plasmáticas de colesterol, glicose e uréia e vacas zebuínas em relação à condição corporal e ao status reprodutivo. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 29 (6), 2036-2042.
- Sant, M., Abreu, A., Silva, L.S., Gottschall, C.S. 2018. Resposta reprodutiva e custo por prenhez em função do escore de condição corporal de novilhas ao acasalamento. *Revista de Iniciação Científica da ULBRA*. 1, (16).
- Santos, G.T., De Marchi, F.E., Damasceno, J.C., Alcade, C.R., Branco, A.F., Cecato, U., Santos, F.S., 2014. Digestibility of canola seeds treated by autoclaving and/or with condensed tannins. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 27, 29-37.
- Santos, J.E.P., Cerri, R.L.A., Sartori, R. 2008. Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology*. 69, 88-97.

- Santos, J.E.P., Bilby, T.R., Thatcher, W.W., Staples, C.R., Silvestre, F.T. 2008. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. 43, 23-30.
- Santos, J.E.P. 2005. Interação nutrição e reprodução da fêmea bovina. In: Grupo de Estudos de Nutrição de Ruminantes. Botucatu, SP: UNESP.
- Santos, V.C., Ezequiel, J.M.B., Oliveira, P.S.N., Galati, R.L. 2009. Consumo e digestibilidade em ovinos alimentados com grãos e subprodutos de canola. *Revista Brasileira Saúde e Produção Animal*. 10, 96-105.
- Santos, W.B.R., Santos, G.T., Neves, C.A., De Marchi, F.E., Kazama, D.C.S., Ítavo, L.C.V., Damasceno, J.C., Petit, H.V. 2012. Rumen fermentation and nutriente flow to the omasum in Holstein cows fed extruded canola seeds treated or not with lignosulfonate. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 41 (7), 1747-1755.
- Scaliante-Júnior, J.R. 2021. Perfil plasmático de ácidos graxos e taxa de concepção em vaca Nelore suplementadas com semente de girassol. Tese de Doutorado – Unesp, Araçatuba. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/202786>.
- Scherer, C., Furlan, A.C., Moreira, I., Poveda, P.A., Carvalho, P.L.O., Toledo, J. 2015. Use of ground and extruded canola seeds in feed for 15-30 kg piglets. *Revista MVZ Córdoba*. 20, 4406-4414.
- Sejrsen, K., Purup, S. 1997. Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy heifers: A review. *Journal of Animal Science*. 75 (3), 828-835.
- Short, R.E., Staigmiller, R.B., Bellows, R.A., Greer, R.C. 2004. Breeding heifers at one year of age: biological and economic considerations. *Factors affecting calf crop*, 55-68.
- Sinclair, K.D., Lunn, L.A., Kwong, W.Y., Wonnacott, K., Linforth, R.S.T., Craigon, J. 2008. Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in-vitro embryo development. *Reproductive BioMedicine Online*. 16 (6), 859-868.
- Sinedino, L.D., Honda, P.M., Souza, L.R., Lock, A.L., Boland, M.P., Staples, C.R., Santos, J.E. 2017. Effects of supplementation with docosahexaenoic acid on reproduction of dairy cows. *Reproduction*. 153 (5), 707-723.
- Sklan, D., Moallem, U., Folman, Y. 1991. Effect of feeding calcium soaps of fatty acids on production and reproductive responses in high producing lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 74 (2), 510-517.
- Soares, P.H.A., Junqueira, F.S. 2019. Particularidades reprodutivas da fêmea bovina: Revisão. *Pubvet*, 13, 1-6.

- Souza, R.T. De. Gonçalves, J.D.L., Santos, S.F.D., Fernandes, A.M.F., Ricci, G.D. 2018. Fatores Relacionados ao Desenvolvimento Reprodutivo em Novilhas Nelore: Revisão. *Pubvet*. 12 (5), 1-10.
- Sovernigo, T.C., Adona, P.R., Monzani, P.S., Guemra, S., Barros, F.D.A., Lopes, F.G., Leal, C.L.V. 2017. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, 52 (4), 561-569.
- Staples, C.R., Thatcher, W.W., Burke, J.M. 1996. Influence of supplemental fat on reproductive tissues of the dairy cow. *Journal Dairy Science*. 79, 1964-1978.
- Staples, C.R., Burke, J.M., Thatcher, W.W. 1998. Influence of Supplemental Fats on Reproductive Tissues and Performance of Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*. 81 (3), 856-871.
- Stojkovic, M., Machado, S.A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Gonçalves, P. B., Wolf, E. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of Reproduction*. 64 (3), 904-909.
- Sturmey, R.G. Reis, A., Leese, H.J., Mcevoy, T.G. 2009. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction in Domestic Animal*. 44 (3), 50-58.
- Talavera, F.C.S., Park, Willians, G.L. 1985. Relationships among dietary lipid intake, serum Cholesterol, and ovarian function in Holstein heifers. *Journal Animal Science*. 60 (4), 1045-1051.
- Tanaka, K. 2005. Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions. *Animal Science Journal*. 76 (4), 291-303.
- Tessaro, F.H., Ayala, T.S., Martins, J.O. 2015. Lipid mediators are critical in resolving Inflammation: a review of the emerging roles of eicosanoids in diabetes mellitus. *BioMed Research International*. 2015, 1-8.
- Thatcher, W.W., Meyer, M.D., Danet-Desnoyers, G. 1995. Maternal recognition of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility-Supplements only*. 49, 15-28.
- Thatcher, W.W., Staples, Ch.R. 2000. Effects of dietary fat supplementation on reproduction in lactating dairy cows. *Adv. Dairy Technology*. 12, 213-232.

- Urlep, Z., Rozman, D. 2013. The interplay between circadian system, cholesterol synthesis, and steroidogenesis affects various aspects of female reproduction. *Frontiers in endocrinology*. 4, 111.
- United States Department of Agriculture (USDA). 2021. Oilseeds: World Markets and Trade.
- Vargas, L.H., Lana, R.D.P., Jham, G.N., Santos, F.L., Queiroz, A.C.D., Mancio, A.B. 2002. Adição de lipídios na ração de vacas leiteiras: parâmetros fermentativos ruminais, produção e composição do leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 31, 522-529.
- Van Blerkom, J. 2011. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*. 11 (5), 797-813.
- Van Hoeck, V., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Pintelon, I., Jorssen, E., Duforte, I, et al. 2015. Interaction between differential gene expression profile and phenotype in bovine blastocysts originating from oocytes exposed to elevated nonesterified fatty acid concentrations. *Reproduction, Fertility Development*. 27 (2), 84-372.
- Van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9 (2), 112-124.
- Vasconcelos, L., Sartori, R., Oliveira, H.N., Guenther, J.G., Wiltbank, M.C. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rates. *Theriogenology*. 56 (2), 307-314.
- Viana, J. 2022. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*. 40 (4), 17.
- Wallace, M., Cottell, E., Gibney, M.J., McAAuliffe, F.M., Wingfield, M., Brennan, L. 2012. An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. *Fertil Steril*. 97 (5), 1078-1088.
- Wathes, D.C., Abayasekara, D.R.E., Aitken, R.J. 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biology. Reproduction*. 77 (2), 190–201.
- Webb, R., Garnsworthy, P.C., Gong, J.G., Armstrong, D.G. 2004. Control of follicular interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*. 82 (13), 63-74.
- Wildman, O.E.E., Jones, G.M., Wagner, P.E. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science*. 65 (3), 495-501.
- Williams, G.L. 1989. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. *Journal. Animal. Science*. 67(3), 785-793.
- Wong, J.L., Wessel, G.M. 2006. Defending the zygote: search for the ancestral animal block to polyspermy. *Current Topics in Developmental Biology*. 72, 1-151.

- Wonnacott, K.E., Kwong, W.Y., Hughes, J., Salter, A.M., Lea, R.G., Garnsworthy, P.C., Sinclair, K.D. 2010. Dietary omega-3 and -6 polyunsaturated fatty acids affect the composition and development of sheep granulosa cells, oocytes and embryos. *Reproduction*. 139, 57–69.
- Wu, L.L.Y., Dunning, K.R., Yang, X., Russell, D.L., Lane, M., Norman, R.J., Robker, R.L. 2010. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus–oocyte complexes and decreased fertilization rates. *Endocrinology*. 151 (11), 5438-5445.
- Yang, X., Dunning, K.R., Wu, L.L.Y., Hickey, T.E., Norman, R.J., Russell, D.L., Liang, X., Robker, R.L. 2010. Identification of Perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. *Reproduction, Fertility and Development*. 22 (8), 1262-1271.
- Zachut, M., Dekel, I., Lehrer, H., Arieli, A., Arav, A., Livshitz, L., Yakoby, S., Moallem, U. 2010. Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality. *Journal of Dairy Science*. 93 (2), 529–545.
- Zanotto, D.L., Ludke, J.V., Guidoni, A.L., Gomes, P.C., Brum, P.A.R., Ajala, L. C. 2009. Utilização do farelo de canola em dietas para suínos em crescimento e terminação. *Archivos de Zootecnia*. 58 (224), 717-728.
- Zeron, Y., Sklan, D., Arav, A. 2002. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Molecular reproduction and development*. 61 (2), 271-278.
- Zeng, X., Li, S., Liu, L., Cai, S., Ye, Q., Xue, B., Zeng, X. 2023. Role of functional fatty acids in modulation of reproductive potential in livestock. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14 (24), 2- 19.

II – OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a suplementação com canola em grão na dieta de novilhas doadoras de oócitos da raça Holandês sobre as concentrações sanguíneas e foliculares de diferentes ácidos graxos e sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da inclusão de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês e seu efeito nas concentrações sanguíneas e foliculares de diferentes ácidos graxos;
- Quantificar o número médio de oócitos totais viáveis e inviáveis aspirados das novilhas de cada grupo experimental;
- Avaliar a taxa de clivagem e a taxa de embriões para cada grupo experimental;
- Analisar se o manejo nutricional proposto melhora a produção *in vitro* de embriões.

1 Artigo III - Uso de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês altera
2 a quantidade e o perfil de ácidos graxos na circulação e no líquido folicular
3

4

5 RESUMO

6

7 A bovinocultura de leite destaca-se na pecuária mundial e nacional, e baseia-se no uso de
8 várias tecnologias reprodutivas, que são influenciadas diretamente pela nutrição do
9 animal. Suplementação com compostos ricos em ácidos graxos essenciais, dentre esses a
10 canola em grão (*Brassica napus L.*) favorece a reprodução dos animais. Objetivou-se
11 neste estudo avaliar o efeito da inclusão de canola em grão na dieta de novilhas da raça
12 Holandês e o efeito nas concentrações sanguíneas e foliculares de diferentes ácidos
13 graxos. O estudo foi conduzido na Fazenda Várzea Grande, município de Floresta, Paraná
14 e foram utilizados 16 animais divididos aleatoriamente em dois tratamentos: T1: Controle
15 (n=8) e T2: Canola (n=8). As dietas foram fornecidas duas vezes ao dia pelo período de
16 100 dias (D100), foram coletadas amostras de sangue e as coletas seguiram nos dias D23,
17 D53 e D75. Não houve diferença na ingestão de matéria seca total, proteína bruta e fibra
18 em detergente neutro. Os animais alimentados com canola em grão apresentaram aumento
19 na quantidade de ácidos graxos totais ($p<0001$) e ácidos graxos poli-insaturados
20 ($p<0001$), entre eles o C18:2n6 e C18:2n3 na circulação e no líquido folicular. Desta
21 forma, pode-se concluir que a inclusão de Canola em grão na dieta de novilhas da raça
22 Holandês altera a quantidade e o perfil de ácidos graxos na circulação e no líquido
23 folicular.

24 Palavras-chave: Ácidos graxos poli-insaturados; bovino; colza; leiteira; metabólitos.

25

26 ABSTRACT

27 Dairy cattle farming stands out in global and national livestock farming and is based on
28 the use of various reproductive technologies, which are directly influenced by the animal's
29 nutrition. Supplementation with compounds rich in essential fatty acids, including canola
30 seed (*Brassica napus L.*) favors the reproduction of these animals. Therefore, the objective
31 of this study was to evaluate the effect of including canola grain in the diet of Holstein
32 heifers and its effect on blood and follicular concentrations of different fatty acids. The

33 study was conducted at Fazenda Várzea Grande, municipality of Floresta, Paraná and 16
34 animals were used, randomly divided into two treatments: T1: Control (n=8) and T2:
35 Canola (n=8). The diets were provided twice a day for a period of 100 days (D100), blood
36 samples were collected and collections continued on days D23, D53 and D75. There was
37 no difference in the intake of total dry matter, crude protein, and neutral detergent fiber.
38 Animals fed with canola grain showed an increase in the amount of total fatty acids
39 ($p<0001$) and polyunsaturated fatty acids ($p<0001$), including C18:2n6 and C18:2n3 in
40 the circulation and follicular fluid. Therefore, it was conclude that the inclusion of Canola
41 grain in the diet of Holstein heifers alters the quantity and profile of fatty acids in the
42 circulation and follicular fluid.

43

44 **Keywords:** Polyunsaturated fatty acids; bovine; rapeseed; milkmaid; metabolites.

45 .

46 1. Introdução

47 A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos tem sido uma das principais
48 técnicas utilizadas no mundo para aumentar o número de descendentes de um animal
49 geneticamente superior, o Brasil é considerado um dos maiores produtores mundiais de
50 embriões bovinos produzidos *in vitro*. A técnica quando utilizada no rebanho leiteiro,
51 além de contribuir para o ganho genético da propriedade, permite a utilização de sêmen
52 sexado de fêmea, aprimorando ainda mais a rentabilidade da propriedade leiteira.

53 No entanto, vários fatores determinam o sucesso da técnica e seus resultados na
54 propriedade leiteira, tais como: o estágio de lactação, o escore de condição corporal, a
55 temperatura ambiente, o nível de produção e a nutrição das doadoras. Dentre os fatores
56 nutricionais, a adição de gordura na dieta, mais precisamente ácidos graxos poli-
57 insaturados (AGPI), vem ganhando destaque nas últimas décadas e trabalhos recentes têm
58 demonstrado que a adição de AGPI na dieta de ruminantes melhoram a qualidade
59 oocitária (Freret *et al.*, 2019), aumenta o desempenho reprodutivo (Sinedino *et al.*, 2017;
60 Moalem, 2018; Fontes *et al.*, 2019), melhora a produção de blastocistos viáveis (Alves,
61 2021), aumenta número de folículos grandes (Robinson *et al.*, 2002; Ambrose *et al.*, 2006;
62 Bilby *et al.*, 2006), diminuição na mortalidade embrionária (Elis *et al.*, 2016) e aumento
63 da concentração circulante hormônios esteroides (Staples *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 2002;
64 Childs *et al.*, 2008; Scaliante-Junior, 2021).

65 Inicialmente, e por um longo período, os pesquisadores procuraram estudar os
66 efeitos pontuais da adição de gorduras nas dietas de vacas leiteira e seus efeitos na
67 reprodução animal, posteriormente, os estudos começaram a preocupar com as fontes de
68 gorduras utilizadas na dieta e a forma de administração, seja em grãos, cápsulas, óleos e
69 ou sais de ácidos graxos. No entanto, recentemente, os trabalhos objetivaram estudar os
70 efeitos individuais de ácidos graxos específicos e suas proporções nas variáveis
71 relacionadas com a reprodução animal (Albuquerque *et al.*, 2009; Ponter *et al.*, 2012;
72 Moallem, 2018; Fontes *et al.*, 2019 e Freret *et al.*, 2019).

73 Dentre as fontes de gordura disponíveis a semente de canola (*Brassica napus L.*)
74 possui alto teor em lipídios (30% a 50% de extrato etéreo (EE) e 23% a 25% de proteína
75 bruta (PB) (Bett *et al.*, 1999), e são compostos por 65% de oleico (C18:1n9), 16% de
76 linoleico (C18:2n6), 7,5% de linolênico (C18:3n3) (Farahmandfar, 2015).

77 Albuquerque *et al.* (2009) trabalharam com vacas da raça Nelore alimentadas com
78 canola e linhaça grão e observaram, após 83 dias de alimentação, que os animais
79 alimentados com canola em grão apresentaram aumento na proporção de ácido linolênico
80 (C18:3n3) quando comparado a linhaça em grão e os animais do grupo controle. Sendo
81 assim, objetivou-se neste estudo verificar o efeito da inclusão de canola em grão na dieta
82 de novilhas e seu efeito nas concentrações sanguíneas e foliculares de diferentes ácidos
83 graxos.

84 **2. Materiais e métodos**

85

86 *2.1 Declaração De Ética*

87

88 O projeto foi aprovado pelo CEUA - Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade
89 Cesumar/ Unicesumar em Maringá, Paraná (parecer 02.2/2023).

90

91 *2.2 Local e Instalações*

92

93 O experimento a campo foi realizado na Fazenda Várzea Grande, localizada na
94 cidade de Floresta, Paraná, Brasil (23°37'15.5"S, 52°04'55.8" W) entre os meses de
95 março de 2022 a novembro de 2022. As análises dos AGs foram realizadas no laboratório
96 interdisciplinar de análises biológicas e químicas (LIABQ) da Unicesumar, as análises
97 Bioquímicas dos metabólitos foram realizadas na Clínica Veterinária Pronto Dog & Cat,

98 e as análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Análises de Alimentos
99 da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

100 2.3 Animais e Dietas

101
102 Foram utilizadas 16 novilhas da raça holandês (*Bos taurus taurus*), com peso médio
103 de 350 Kg, idade variando entre 12 e 15 meses, escore de condição corporal (ECC) entre
104 3,0 a 3,5, em uma escala de 1 a 5 (Wildman *et al.*, 1982).

105 Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos com 08 animais
106 cada: T1: Controle e T2: Canola, os quais foram alojados, de acordo com cada tratamento,
107 em baias coletivas, com 20 m² por animal e 8,0 metros de linha de cocho. As dietas foram
108 formuladas de acordo com as exigências nutricionais do NRC (2001) para gado de leite
109 considerando novilhas da raça Holandês, com 340 kg de peso vivo (PV) e ganho de peso
110 médio diário de 700 gramas. Foram fornecidos 2,2% do PV em matéria seca (MS),
111 totalizando o consumo de 6,50 Kg de MS/animal/dia, composto por 4,73 kg de MS
112 oriundo de silagem de milho e 1,77 kg de concentrado MS/animal/dia, oriundo das dietas
113 experimentais (Tabela 1) pelo período de 100 dias.

114 Tabela 1- Composição (kg/MS) das dietas experimentais

| Ingredientes | Dietas experimentais (kg/MS) | |
|------------------------|------------------------------|-------------|
| | T1 - Controle | T2 - Canola |
| Silagem de milho | 4,73 | 4,73 |
| Milho grão moído | 1,17 | 0,77 |
| Farelo de Soja | 0,54 | 0,34 |
| Canola em grão | - | 0,60 |
| Bovigold* | 0,06 | 0,06 |
| Total | 6,50 | 6,50 |
| Composição química (%) | | |
| EE | 2,33 | 4,05 |
| NDT | 67,18 | 68,89 |
| PB | 10,22 | 9,94 |
| FDN | 42,16 | 43,98 |
| FDA | 23,66 | 25,08 |
| Ca | 0,38 | 0,27 |
| P | 0,11 | 0,10 |

115 * Suplemento mineral e vitamínico, composição por kg do produto: Flúor, 600,00 mg; Vit. E 2,400 UI; Vit.
116 D3 100.000 UI; Vit. A 400.000 UI; Zinco 2.500_mg; Selênio 19,00_mg; Manganês 1.600_mg; Iodo
117 40,00_mg; Ferro 700,00_mg; Cromo 10,00_mg; Cobre 700,00_mg; Cobalto 15,00_mg; Sódio 70,00_g;
118 Potássio 35,00_g; Magnésio 20,00_g; Enxofre 20,00_g; Fósforo 60,00_g; Cálcio máx. 220,00_g; Cálcio min.
119 190,00_g.

120 Os dados para determinação do consumo de MS e nutrientes foram obtidos através
121 dos registros do alimento oferecido e sobras diariamente durante todos os dias do período
122 experimental. As amostras das dietas foram coletadas semanalmente congeladas a -10°C
123 e ao final de cada mês e foram descongeladas, compostas por tratamento, foi retirada uma
124 alíquota de aproximadamente 600 gramas. As alíquotas foram secas em estufas de
125 ventilação forçada (55 a 60 °C) por 72 h para determinação da MS com a AOAC (1990)
126 e moídas em um moinho da marca Willei com peneiras de 1 mm.

127 A determinação de MS, PB, EE, cinzas, cálcio e fósforo foram determinados de
128 acordo com Silva (1981) e as determinações de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra
129 em detergente ácido (FDA) foram realizadas seguindo a metodologia de Van Soest
130 (1991).

131 As dietas experimentais foram analisadas quanto à composição de AGs (Tabela
132 2). Para tanto, a gordura nas amostras das dietas foi separada conforme descrito por Bligh
133 e Dyer (1959) e os AG foram metilados de acordo com o método 5509 da ISO (ISSO,
134 1978) usando KOH/metanol (Synth, São Paulo, Brasil) e n-heptano (Vetec, Rio de
135 Janeiro, RJ, Brasil). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram quantificados por
136 cromatografia gasosa (Trace GC Ultra, Termo Scientific, West Palm Beach, Flórida,
137 EUA) equipada com amostrador automático, com uma ionização por chama e uma coluna
138 capilar de sílica fundida Rt-2560 (100 m e 0,25 mm i.d., espessura de filme de 0,20 µm).
139 Os parâmetros da coluna foram os seguintes: a temperatura inicial da coluna de 65 °C foi
140 mantida por 8 min; a temperatura foi programada em 10 °C/ min até 210 °C; esta
141 temperatura foi mantida por 10 min e então aumentada 5 °C/ min até 240 °C e
142 permaneceu por 8 min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 240 e 250 °C,
143 respectivamente. O fluxo de gás foi de 45 mL/ min para hidrogênio (gás de arraste), 45
144 mL/min para N₂ (gás auxiliar), 45 mL/ min para H₂ e 400 mL/ min para ar comprimido.
145 Os picos de ácidos graxos foram identificados usando o padrão de éster metílico puro F.
146 A. M. E 18919 (Sigma Aldrich, São Paulo, SP, Brasil).-

147

148

149

150

151 Tabela 2. Composição de ácidos graxos das dietas experimentais, T1 = Controle e T2=
 152 Canola (%)

| Ácido graxo (%) | T1 | T2 |
|---------------------------------|--------|--------|
| Octanoico (C8) | 0,025 | 0,005 |
| Cáprico (C10:0) | 0,013 | 0,000 |
| Undecanoico (C11:0) | 0,030 | 0,015 |
| Láurico (C12:0) | 0,283 | 0,113 |
| Tridecanoico (13:0) | 0,035 | 0,015 |
| Mirístico (C14:0) | 0,468 | 0,225 |
| Miristoleico (C14:1) | 0,055 | 0,015 |
| Pentadecanoico (C15:0) | 0,058 | 0,053 |
| Pentadecenoico (C15:1) | 0,023 | 0,018 |
| Palmítico (C16:0) | 20,205 | 10,605 |
| Palmitoleico (C16:1) | 0,615 | 0,373 |
| Heptadecanoico (C17:0) | 0,315 | 0,145 |
| Heptadecanoico cis 10 (C17:1) | 0,088 | 0,090 |
| Estearico (C18:0) | 3,790 | 2,583 |
| Oleico (C18:1n9c) | 35,400 | 49,550 |
| Linoleico (C18:2n6c) | 29,848 | 27,418 |
| α - linolênico (C18:3n3) | 3,655 | 5,103 |
| Gadoleico (C20:1) | 0,670 | 0,928 |
| Eicosadienoico (C20:2) | 0,050 | 0,058 |
| Eicosatrienoico (C20:3) | 0,015 | 0,005 |
| Behênico (C22:0) | 0,678 | 0,485 |
| Tetradecenoico cis -13- (C22:1) | 0,453 | 0,313 |
| Docosadienoico (C22:2n6) | 0,068 | 0,010 |
| Tricosanoico (C23:0) | 0,493 | 0,108 |
| Tetracosanoico (C24:0) | 0,750 | 0,498 |
| Lignoceroleico (C24:1) | 0,033 | 0,230 |
| Ácidos graxos saturados (AGS) | 27,203 | 14,905 |
| Ácidos graxos insaturados (AGI) | 70,995 | 84,108 |
| Ómega 6 (n-6) | 29,848 | 27,418 |
| Ómega 3 (n-3) | 3,753 | 5,118 |
| n-6/n-3 | 8,015 | 5,333 |
| Outros | 1,828 | 0,987 |

153

154 *2.4 Coleta de Sangue*

155

156 Amostras de sangue foram coletadas da veia caudal em tubos vacutainer (Becton,
 157 Dickinson and Company; BD) contendo 2% de EDTA nos dias D23, D53, D75 das dietas
 158 experimentais (Figura 1). Foram coletados aproximadamente 10 mL de

159 sangue/animal/dia. O sangue foi centrifugado a 2500 g durante 20 min. Após a
 160 centrifugação o plasma foi removido e acondicionado em microtubos de 1,5 mL. As
 161 amostras de plasma foram armazenadas a -80 °C até as análises das concentrações de
 162 ácidos graxos.

163 2.5 Coleta do Líquido Folicular

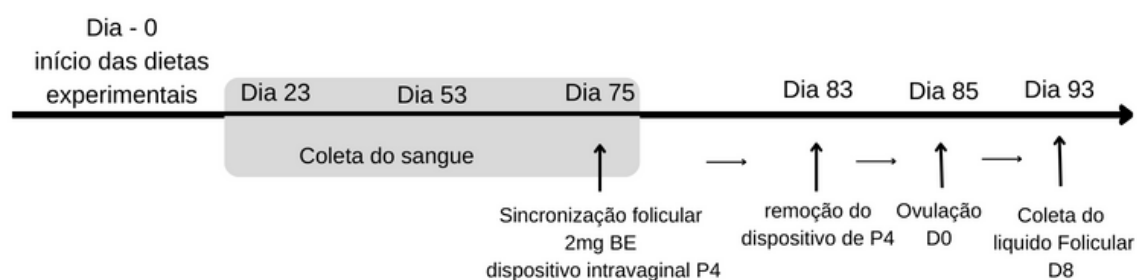
164

165 Para a coleta do líquido folicular as novilhas da raça Holandês foram submetidas
 166 ao protocolo farmacológico de sincronização da ovulação em um dia aleatório do ciclo
 167 estral (D10), que ocorreu a partir do dia 75 da dieta, este protocolo baseia-se na aplicação
 168 intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) e introdução de um dispositivo
 169 intravaginal de progesterona (P4) (CIDR 1,9g – Zoetis). No Dia oito (D8) este dispositivo
 170 foi removido e foram aplicados 150 µg de D-cloprostenol de sódio, 300 UI de
 171 gonadotrofina coriônica equina e 1,0 mg de cipionato de estradiol por via intramuscular.
 172 O dia zero (D0), 48 h após a remoção do dispositivo de progesterona, foi considerado dia
 173 da ovulação e oito dias após foi realizada a coleta do líquido folicular no dia 93 da dieta
 174 (Figura 1).

175 Amostras do líquido folicular foram coletadas de novilhas por aspiração
 176 transvaginal guiada por ultrassom (OPU), de ovários com presença de corpos lúteos e
 177 diâmetro folicular variando de 10 a 14 mm, com auxílio de uma agulha de calibre 20
 178 usando um transdutor convexo de 5,0 MHz equipado com uma extensão de 50 cm para
 179 acesso intravaginal, conforme descrito por Ginther *et al.* (1997). As amostras de líquido
 180 folicular foram centrifugadas a $500 \times g$ por 10 min, decantadas e armazenadas a -20 °C
 181 até as análises dos ácidos graxos. O sedimento celular foi descartado.

182 Figura 1. Esquema da coleta de sangue e do líquido folicular

183



185 Fonte: Elaborado pelo autor

186 *2.6 Esterificação Direta de AGs em Sangue e Líquido Folicular*
187

188 A esterificação direta foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de
189 Santos *et al.* (2018). Amostras (100 mg) de plasma sanguíneo e líquido folicular
190 (liofilizado) foram adicionadas em tubos cônicos, contendo 2,0 mL de solução metanólica
191 de NaOH 1,25 mol L⁻¹ e transferidas para um banho ultrassônico com potência de 135 W
192 e 40 kHz por 15 min. Na sequência foram adicionados 2,0 mL de solução metanólica de
193 HCl 1,5 mol L⁻¹ em e novamente transferidos para o banho ultrassônico por 15 min. Para
194 finalizar, 1,0 mL de n-hexano (grau ultrapuro) foi adicionado ao tubo e agitado
195 vigorosamente por 30 s, depois centrifugado a 2000 rpm por 5 min. (etapa repetida por
196 três vezes). As fases superiores foram coletadas, evaporadas até 500 µL e injetadas no
197 cromatógrafo gasoso (GC).

198 *2.7 Identificação dos AGs por Cromatografia em fase Gasosa Acoplada À*
199 *Espectrometria de Massa (GC-MS)*
200

201 As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás (Agilent 7890B) equipado com
202 coluna capilar Agilent HP-5MS-UI com fase fenil metil siloxano 5% (30,0 m x 250 µm
203 id x 0,25 µm espessura do filme), com o injetor automático (CTC PAL Control) e
204 espectrômetro de massa (Agilent 5977A MSD). Para a análise 1 µL da amostra foi
205 injetado na coluna usando o modo de injeção Split na proporção 1:20, nas seguintes
206 condições de forno: temperatura inicial de 50 °C mantida por 4 min, seguido de
207 aquecimento de 40 °C min⁻¹ até 220 °C mantida por 12 min, e finalizando com
208 aquecimento de 50 °C min⁻¹ até 300 °C e mantida por 2 min. As demais condições do
209 método de análise: fluxo de gás de arraste (He, pureza 99,9%) 1,0 mL min⁻¹ e
210 temperaturas do injetor e linha de transferência de 235°C.

211 Os espectros de massa foram obtidos por meio de ionização por impacto eletrônico
212 (70 eV) no modo de varredura na relação massa/carga de 50 a 600 *m/z*, com temperatura
213 da fonte de ionização de 230 °C e temperatura quadrupolo a 150 °C. Os ésteres metílicos
214 de AGs foram identificados por comparação com espectros de massa da biblioteca NIST
215 11.0 e por uma mistura de ésteres metílicos de AGs padrão (F.A.M.E. de C4-C24, Supelco
216 TM 37 Mix 18919, EUA; Sigma-Aldrich).

217 *2.8 Quantificação Dos AGs por Cromatografia em Fase Gasosa Com Detector De*
218 *Ionização De Chama (GC/FID)*
219

220 As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás (Agilent 7890B) equipada
221 com detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar Agilent HP5 com uma
222 fase de 5% de fenil metil siloxano (30,0 m x 250 µm id x 0,25 µm de espessura do filme)
223 foi realizada. Para a análise, 2 µL de amostra foram injetados na coluna usando o modo
224 de injeção Splitless, nas seguintes condições de forno: temperatura inicial do forno de
225 65 °C mantida por 4 min, seguido de aumento de 16 °C min⁻¹ até 185 °C mantido por 12
226 min, novo aquecimento de 20 °C min⁻¹ até 235 °C mantido por 14 min e finalizando com
227 aquecimento de 35 °C min⁻¹ a 300 °C e mantido por 1 min. As demais condições do
228 método de análise: fluxo de gás de arraste (He, pureza 99,99999%) 1,4 mL min⁻¹,
229 temperatura do injetor de 235 °C e temperatura do detector de ionização em chama de
230 350 °C com vazões de H₂ de 35 mL min⁻¹, ar sintético de 300 mL min⁻¹ e N₂ de 25 mL
231 min⁻¹.

232 Os ésteres metílicos de AGs das amostras foram quantificados por comparação
233 com o padrão F.A.M.E., curvas analíticas foram realizadas nas concentrações de 62,5;
234 125,0; 250,0; 500,0; 1000,0 e 5000,0 µg mL⁻¹, e os resultados foram expressos em µg g⁻¹
235 ¹ de peso seco. As análises foram realizadas em triplicata (experimentos independentes).

236

237 2.9 Análises Estatísticas

238

239 As variáveis foram analisadas pelo procedimento *PROC GLM* do programa
240 estatístico SAS[®] OnDemand for Academics (2024). As médias foram analisadas pelo
241 método das médias dos quadrados mínimos (*Least Squares Means - LSM*).

242

243 3. Resultados

244

245 Na Tabela 3 não se observou diferença na ingestão de MS, PB e FDN, entretanto, os
246 animais alimentados com canola ingeriam maior quantidade de gordura quando
247 comparado aos animais do grupo controle, ocorrendo, obviamente, pela inclusão de
248 Canola em grão na dieta dos animais.

249

250 Tabela 3. Efeito da inclusão de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês na
 251 ingestão diária de matéria seca (IMS), proteína bruta (IPB), extrato etéreo (IEE) e fibra
 252 em detergente neutro (IFDN)

| Variáveis kg/MS/dia | Tratamentos | | |
|------------------------|-------------|-------------|------------|
| | T1-Controle | T2-Canola | Valor de p |
| IMS | 8,43 ± 1,12 | 8,86 ± 0,83 | 0,15 |
| IPB | 0,86 ± 0,11 | 0,83 ± 0,08 | 0,22 |
| IEE | 0,20 ± 0,03 | 0,36 ± 0,03 | 0,33 |
| IFDN | 3,56 ± 0,47 | 3,90 ± 0,36 | 0,25 |

253

254 Na Tabela 4 pode-se verificar que os animais alimentados com Canola em grão
 255 apresentam diferentes AGs no plasma (C6:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:1, C14:0,
 256 C15:0, C16:1, C17:1, C17:0, C18:2n6c, C18:2n3, C18:1n9c, C18:0, C20:4n6, C20:0,
 257 C21:0, C21:1, C22:1n9, C22:1n9, C22:0, C23:0 e C24:0) e no líquido folicular (C10:0,
 258 C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:1, C17:1, C17:0, C18:2n6c, C18:2n3, C18:1n9c, C18:0,
 259 C20:4n6, C20:0, C21:0, C21:1, C22:1n9, C22:1n9, e C22:0) quando comparado ao
 260 plasma (C6:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:1, C14:0, C15:0, C16:1, C17:0, C18:0,
 261 C19:0, C25:0, C20:0, C21:0, C21:1, C22:1n9 e C22:0) e líquido folicular (C6:0, C10:0,
 262 C11:0, C12:0, C13:0, C14:1, C14:0, C15:0, C16:1, C18:2n6c, C18:3n6, C18:3n6 e
 263 C18:1n9c) dos animais do grupo controle.

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273 Tabela 4. Ácidos graxos identificados por CG/MS (esterificação direta) em *pool* de
 274 amostras de líquido folicular (LF) e de plasma de novilhas da raça Holandês alimentadas
 275 com dieta com e sem canola em grão

| Ácidos graxos | Controle | | Canola | |
|--------------------------------|----------|--------|--------|--------|
| | LF | Plasma | LF | Plasma |
| Caproico (C6:0) | • | • | | • |
| Cáprico (C10:0) | • | • | • | • |
| Undecanoico (C11:0) | • | • | | • |
| Láurico (12:0) | • | • | • | • |
| Tridecanoico (13:0) | • | • | • | • |
| Miristoleico (C14:1) | • | • | | • |
| Mirístico (C14:0) | • | • | • | • |
| Pentadecanoico (C15:0) | • | • | • | • |
| Palmitoleico (C16:1) | • | • | • | • |
| Palmítico (C16:0) | • | • | • | • |
| Heptadecanoico cis 10 (C17:1) | | | | • |
| Heptadecanoico (C17:0) | | • | • | • |
| Esteárico (C18:0) | • | • | • | • |
| Oleico (C18:1n9c) | • | | • | • |
| Linoleico (C18:2n6c) | • | | • | • |
| α -linolênico (C18:3n3) | | | • | • |
| γ -linolênico (C18:3n6) | • | | • | • |
| Araquidônico (C20:4n6) | | | • | • |
| Araquídico (C20:0) | • | | • | • |
| Heneicosanoico (C21:0) | | | • | • |
| Eicosenoico (C21:1n11) | | | • | • |
| Behênico (C22:0) | • | • | • | • |
| Docosadienoico (C22:2n6) | | | | • |
| Tricosanoico (C23:0) | | | | • |
| Lignocérico (C24:0) | | | • | • |
| Nonadecanoico (C19:0) | • | • | | |
| Pentacosanoico (C25:0) | • | • | | |

276

277 Na Tabela 5 pode-se verificar aumento ($p < 0,005$) na quantidade absoluta ($\mu\text{g g}^{-1}$
 278 DP) dos ácidos graxos: C14:1, C14:0, C16:1, C16:0, C17:1, C18:0, C18:1n9c, C18:2n6c,
 279 C18:3n3, C18:3n6, C20:4n6, C20:0, C21:0, C21:1, C22:1n9, C22:2n6, C22:0, C23:0 e
 280 C24:0) e queda na quantidade de ácidos graxos: C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C15:0,
 281 C18:0, C19:0 e C25:0 no plasma, nos três momentos de coleta, nos animais alimentados
 282 com canola quando comparado aos animais do grupo controle.

283

284 Tabela 5. Média da quantificação por CG/FID de ácidos graxos (esterificação direta) em
 285 amostras de plasma de novilhas alimentadas com dieta com e sem canola em grão, de
 286 acordo com a coleta de sangue ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS, peso seco)

| Ácidos graxos | Plasma Sanguíneo | | EPM | Valor de p |
|---------------------------------|------------------|--------------------|----------|------------|
| | Controle | Canola | | |
| Caproico (C6:0) | 26,79±17,09 | 22,38±25,63 | 4,44 | 0,4864 |
| Cáprico (C10:0) | 26,95±19,86 | 14,60±14,19 | 3,52 | 0,0169 |
| Undecanoico (C11:0) | 76,29±25,11 | 40,68±26,53 | 5,27 | 0,0001 |
| Láurico (12:0) | 679,09±157,11 | 35,38±27,01 | 23,00 | 0,0001 |
| Tridecanoico (13:0) | 30,96±11,91 | 20,22±16,14 | 2,89 | 0,0118 |
| Miristoleico (C14:1) | 20,54±9,69 | 28,93±7,91 | 1,80 | 0,0019 |
| Mirístico (C14:0) | 16,60±6,93 | 25,23±8,49 | 1,58 | 0,0004 |
| Pentadecanoico (C15:0) | 396,53±130,43 | 40,37±8,66 | 18,86 | 0,0001 |
| Palmitoleico (C16:1) | 16,34±7,11 | 29,00±10,40 | 1,81 | 0,0001 |
| Palmítico (C16:0) | 66,82±9,09 | 6.377,98±2.009,71 | 290,07 | 0,0001 |
| Heptadecanoico cis 10 (C17:1) | 0,00 ± 0,00 | 37,36±14,17 | 2,04 | 0,0001 |
| Heptadecanoico (C17:0) | 410,35± 299,89 | 34,68±18,76 | 43,37 | 0,0001 |
| Esteárico (C18:0) | 24,85±18,29 | 4.270,13±775,19 | 111,92 | 0,0001 |
| Oleico (C18:1n9c) | 0,00 ± 0,00 | 8.040,67±12.699,32 | 1.832,98 | 0,0033 |
| Linoleico (C18:2n6c) | 0,00 ± 0,00 | 79,85±23,88 | 3,44 | 0,0001 |
| α - linolênico (C18:3n3) | 0,00 ± 0,00 | 22,51±6,51 | 0,93 | 0,0001 |
| γ -linolênico (C18:3n6) | 0,00 ± 0,00 | 35,43±10,96 | 1,58 | 0,0001 |
| Araquidônico (C20:4n6) | 0,00 ± 0,00 | 23,08±10,97 | 1,58 | 0,0001 |
| Araquídico (C20:0) | 1,25±0,69 | 23,51±5,75 | 0,83 | 0,0001 |
| Heneicosanoico (C21:0) | 0,00 ± 0,00 | 11,94±8,19 | 1,18 | 0,0001 |
| Eicosenoico (C21:1n11) | 0,00 ± 0,00 | 568,82±196,06 | 28,29 | 0,0001 |
| Erúcido (C22:1n9) | 0,00 ± 0,00 | 33,94±9,25 | 1,33 | 0,0001 |
| Behênico (C22:0) | 1,62±0,90 | 15,66±5,56 | 0,81 | 0,0001 |
| Docosadienoico (C22:2n6) | 0,00 ± 0,00 | 15,24±11,68 | 1,68 | 0,0001 |
| Tricosanoico (C23:0) | 0,00 ± 0,00 | 7,06±6,63 | 0,95 | 0,0001 |
| Lignocérico (C24:0) | 0,00 ± 0,00 | 20,76±7,78 | 1,25 | 0,0001 |
| Nonadecanoico (C19:0) | 1,73±1,09 | 0,00 ± 0,00 | 0,15 | 0,0001 |
| Pentacosanoico (C25:0) | 1,43±1,33 | 0,00 ± 0,00 | 0,19 | 0,0001 |

287

288 Semelhante a quantidade de ácidos graxos no plasma, podem observar na Tabela
 289 6 que a quantidade absoluta de ácidos graxos: C16:0, C18:1n9c, C18:0, C18:2n6c,
 290 C18:3n3, C18:3n6, C20:4n6, C20:0, C22:1n9, C22:0 e C24:0) no líquido folicular ($\mu\text{g g}^{-1}$

291 ¹ DP), também foi maior ($p < 0,005$) nos animais alimentados com Canola em grão quando
 292 comparado com a quantidade de ácidos graxos: C6:0, C10:0, C11:0, C12:0, e C13:0 nos
 293 animais do grupo controle, não existindo diferença ($p > 0,06$) para os ácidos graxos C14:0,
 294 C14:1, C16:1, C20:0, C21:0 e C21:1n11.

295 Tabela 6. Média da quantificação por CG/FID de ácidos graxos (esterificação direta) em
 296 *pool* de amostras de líquido folicular de novilhas da raça Holandês, alimentadas com dieta
 297 com e sem canola em grão ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)

| Ácidos graxos | Líquido folicular | | EPM | Valor de p |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|--------|------------|
| | Controle | Canola | | |
| Caproico (C6:0) | 24,58 ± 26,29 | 0,00 ± 0,00 | 7,02 | 0,0153 |
| Cáprico (C10:0) | 18,11 ± 16,56 | 3,17±8,39 | 4,83 | 0,0249 |
| Undecanoico (C11:0) | 28,58 ± 23,83 | 0,00 ± 0,00 | 6,01 | 0,0024 |
| Láurico (12:0) | 181,69 ± 112,94 | 10,97±18,76 | 25,27 | 0,0001 |
| Tridecanoico (13:0) | 37,80±37,71 | 6,33±16,74 | 10,91 | 0,0342 |
| Miristoleico (C14:1) | 5,10±9,46 | 0,00 ± 0,00 | 2,66 | 0,1478 |
| Mirístico (C14:0) | 11,18±9,26 | 15,20±11,01 | 3,75 | 0,6556 |
| Pentadecanoico (C15:0) | 45,44±82,85 | 32,30±45,66 | 26,32 | 0,6076 |
| Palmitoleico (C16:1) | 10,38±16,45 | 2,91±7,71 | 5,03 | 0,2329 |
| Palmítico (C16:0) | 43,29±21,76 | 8.068,14±1296,36 | 346,48 | 0,0001 |
| Heptadecanoico cis 10 (C17:1) | 23,29 ± 23,29 | 8,74 ± 16,34 | 4,83 | 0.0549 |
| Heptadecanoico (C17:0) | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | | |
| Estearico (C18:0) | 0,00 ± 0,00 | 1.696,70±518,71 | 138,63 | 0,0001 |
| Oleico (C18:1n9c) | 8,12±8,82 | 3.452,94±1.460,32 | 390,29 | 0,0001 |
| Linoleico (C18:2n6c) | 1,73±1,68 | 141,36±171,73 | 45,89 | 0,0529 |
| α -linolênico (C18:3n3) | 0,00 ± 0,00 | 61,84±82,86 | 22,14 | 0,0718 |
| g -linolênico (C18:3n6) | 2,02±2,70 | 119,90±67,91 | 18,16 | 0,0006 |
| Araquidônico (C20:4n6) | 0,00 ± 0,00 | 20,96±14,35 | 3,83 | 0,0023 |
| Araquídico (C20:0) | 0,00 ± 0,00 | 8,50±14,01 | 3,74 | 0,1344 |
| Heneicosanoico (C21:0) | 0,00 ± 0,00 | 7,89±16,23 | 4,33 | 0,2230 |
| Eicosenoico (21:1n11) | 0,00 ± 0,00 | 893,56±1.852,87 | 495,19 | 0,2261 |
| Erúcico (C22:1n9) | 0,00 ± 0,00 | 31,33±12,43 | 3,32 | 0,0001 |
| Behênico (C22:0) | 0,00 ± 0,00 | 14,56±8,91 | 2,38 | 0,0010 |
| Docosadienoico(C22:2n6) | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | | |
| Tricosanoico (C23:0) | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | | |
| Lignocérico (C24:0) | 0,00 ± 0,00 | 7,70±9,44 | 2,52 | 0,0518 |
| Nonadecanoico (C19:0) | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | | |
| Pentacosanoico (C25:0) | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | | |

298

299 A quantidade de ácidos graxos totais (AGT), ácidos graxos saturados (AGS),
 300 ácidos graxos insaturados (AGI), ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), ácidos graxos
 301 poli-insaturados (AGPI) expressos em microgramas por grama de plasma sanguíneo e ou
 302 líquido folicular foram maiores ($p < 0,005$), respectivamente nos animais alimentados com
 303 canola em grão comparado aos animais do grupo controle (tabela 5 e 6).

304 Quanto à proporção das diferentes classes de AGs no plasma sanguíneo e líquido
 305 folicular, podem observar na Tabela 7 que a percentagem de AGS foi maior nos animais
 306 do grupo controle comparado aos animais alimentados com canola em grão. Todavia, a
 307 percentagem de AGI, AGMI e AGPI foram maiores nos animais alimentados por canola
 308 em grão comparado ao grupo controle.

309 Tabela 7. Média da quantificação por CG/FID (esterificação direta) de ácidos graxos
 310 totais (AGT), saturados (AGS), insaturados (AGI), monoinsaturados (AGMI) e poli-
 311 insaturados (AGPI) e porcentagem em *pool* de amostras de líquido folicular e amostras
 312 de plasma de novilhas da raça Holandês, alimentadas com dieta com e sem canola em
 313 grão

| AG | Grupo controle | | Grupo canola | | Valor de p |
|--------------------------|--|--------|--|--------|------------|
| | Quantidade ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) | (%) | Quantidade ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) | (%) | |
| Plasma | | | | | |
| AGS | 1.777,85 \pm 432,54a | 97,76A | 10.984,93 \pm 2.295,39b | 61,07B | <0,0001 |
| AGI | 36,88 \pm 14,58a | 2,24A | 8.914,84 \pm 12.751,03b | 38,93B | 0,0036 |
| AGMI | 36,88 \pm 14,58a | 2,24A | 8.738,73 \pm 12.734,85b | 37,96B | 0,0016 |
| AGPI | 0,00 \pm 0,00a | 0,00A | 176,11 \pm 45,37b | 0,97B | <0,0001 |
| AGT | 1.814,73 \pm 428,83a | | 19.899,77 \pm 13.098,23b | | <0,0001 |
| Líquido folicular | | | | | |
| AGS | 390,65 \pm 261,79a | 76,75A | 9.871,46 \pm 1.329b | 68,18B | <0,0001 |
| AGI | 47,73 \pm 31,99a | 10,75A | 4.733,54 \pm 1.763,24b | 31,82B | <0,0001 |
| AGMI | 43,98 \pm 28,79a | 9,99A | 4.389,49 \pm 1.781,23b | 29,51B | <0,0001 |
| AGPI | 3,75 \pm 3,81a | 0,77A | 344,06 \pm 223,59b | 2,31B | 0,0017 |
| AGT | 438,38 \pm 288,83a | | 14.605,00 \pm 2.139,70b | | <0,0001 |

314 ^{a,b} Médias seguida de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si estatisticamente
 315 ($p < 0,005$). ^{A,B} Médias seguida de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si
 316 estatisticamente ($p < 0,005$).

317

318 **4. Discussão**

319

320 A adição de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês não alterou a
321 IMS, IPB, IFDN. O fornecimento de lipídios, em níveis superiores a 7%, geralmente,
322 causa redução no consumo voluntário do alimento e digestibilidade dos nutrientes,
323 principalmente da fibra (De Souza, 2022), este efeito negativo pode estar associado aos
324 efeitos tóxicos dos ácidos graxos de cadeia média e longa sobre os microrganismos
325 ruminais, principalmente aqueles associado a digestão das fibras (Palmquist; Mattos,
326 2011), fato este não encontrado neste experimento, pois o teor de EE ficou em 4,5%.

327 A inclusão de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês proporcionou
328 aumento ($p < 0,0001$) na quantidade absoluta ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) de AGT no plasma, entre eles
329 alguns específicos como: C18:1n9, C18:2n6, C18:3n3, C18:3n6 e C20:4, quando
330 comparado aos animais do grupo controle. Estes AGs, considerados essenciais, não
331 podem ser sintetizados *de novo* nos mamíferos (Mattos et., 2004) e devem estar,
332 obrigatoriamente, presentes na dieta. Este aumento se deve, obviamente, pela presença
333 do óleo no grão de canola apresentando diferentes concentrações de ácidos graxos
334 saturados (AGS), monoinsaturados (AGI) e poli-insaturados (AGPI), fato observado por
335 outros autores (Albuquerque *et al.*, 2009; Fontes *et al.*, 2019 e Moallem, 2018) ao
336 alimentar vacas com diferentes fontes de gordura.

337 Devem enfatizar que o perfil de AGs no plasma sanguíneo não espelha aqueles
338 presentes na dieta, pois a biohidrogenação de AGs insaturados realizada pelos
339 microrganismos presentes no rúmen podem diminuir a disponibilidade dos mesmos para
340 a posterior absorção intestinal (Oliveira *et al.*, 2004). Desta forma, o fornecimento de
341 canola na forma de grão inteiro pode proporcionar proteção natural, e de acordo com Petit
342 *et al.* (2002) a gordura presente nos grãos de oleaginosas poderia estar associada a uma
343 matriz proteica presente no grão, que poderia diminuir o acesso dos microrganismos ao
344 óleo presente no mesmo.

345 A biohidrogenação de ácidos graxos no rúmen, poderia ainda, justificar a baixa
346 quantidade absoluta, ausência total ou indetectável de alguns ácidos graxos essenciais
347 (C18:2n6, C18:3n3, C18:3n6) no plasma sanguíneo dos animais do grupo controle, que
348 apesar de estar presentes na dieta não apareceram no plasma sanguíneo. Além do mais, a

349 moagem do milho grão utilizada na dieta do grupo controle poderia facilitar o acesso dos
350 microrganismos ao óleo presente no grão. Albuquerque *et al.* (2009) também não
351 encontraram alguns AGs essenciais no plasma e no líquido folicular, nos animais do
352 grupo controle, ao trabalharem com vacas da raça Nelore alimentadas com grãos de
353 canola e grãos de linhaça.

354 Houve aumento absoluto na quantidade de AGT, AGI, AGMI e AGPI no líquido
355 folicular nos animais alimentados com canola em grão comparado aos animais do grupo
356 controle. Vale ressaltar que a composição de AGs no líquido folicular parece espelhar, os
357 AGs presentes na circulação (Freret *et al.*, 2019). O líquido folicular é o ambiente em que
358 ocorre o crescimento e maturação do oócito e o seu conteúdo vem através da circulação,
359 via medula e córtex ovariano, ou através de componentes secretados pelas camadas de
360 células da granulosa presentes nos folículos (Zeng *et al.*, 2023). Foi detectada, ainda que
361 pequena, a presença de alguns ácidos graxos insaturados (C18:1n9, C18:2n6 e C18:3n6),
362 no líquido folicular nos animais do grupo que estavam ausentes no plasma, podendo
363 ocorrer simplesmente pelo aumento da concentração em reduzido do líquido folicular,
364 comparado ao plasma sanguíneo.

365 Vários dos efeitos benéficos da adição de gordura na dieta ou do aumento de AGs
366 específicos, no aumento do número de folículos totais, na quantidade de oócitos aspirados,
367 na esteroidogênese folicular, no tamanho do folículo ovulatório e na qualidade do corpo
368 lúteo (CL) ocorrem através do aumento na quantidade de AGs presentes no ovário e mais
369 precisamente no líquido folicular (Moallem *et al.*, 2013 e Moallem, 2018). Algumas
370 pesquisas (Moallem, 2018; Freret *et al.*, 2019) têm associado a presença do ácido
371 linolênico (C18:3n3 e C18:3n6) no líquido folicular com aumento no número de folículos
372 totais, com a melhora na qualidade dos oócitos e na produção de embriões *in*
373 *vitro*. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar a maneira pelo qual alguns
374 AGs da série 3 estariam afetando o crescimento folicular e a qualidade do oócito.

375 Foi também observado aumento na quantidade absoluta de ácidos graxos de cadeia
376 média (C10 a C16) e de cadeia ímpar (C11:0, C13:0, C15:0, C19:0 e C25:0), no plasma
377 e líquido folicular dos animais do grupo controle comparado aos animais alimentados
378 com canola em grão, os ácidos graxos de cadeia ímpar são originários dos lipídios
379 microbianos sintetizados a partir do propionato e do valerato presente no rúmen
380 (Mansbridge; Blake, 1997), desta forma, o aparecimento destes ácidos graxos no plasma

381 e no líquido folicular reflete a síntese de ácido graxo microbiano somada a síntese de
382 células microbianas (Eifert *et al.* 2006).

383 Esta intensa biohidrogenação de ácidos graxos no rúmen dos animais do grupo
384 controle poderia justificar o aumento na porcentagem relativa de AGS, queda da
385 proporção de AGMI e ausência de AGPI no plasma e no líquido folicular, quando
386 comparado aos animais alimentados com canola em grão. Albuquerque *et al.* (2009) não
387 encontraram diferença na porcentagem de AGS no plasma e líquido folicular em vacas de
388 corte alimentadas com canola em grão, comparado aos animais do grupo controle, mas
389 semelhante ao resultado deste experimento, os autores também observaram aumento na
390 proporção de AGPI no líquido folicular dos animais alimentados com canola em grão.

391

392 **5. Conclusão**

393

394 Conclui-se que o fornecimento de canola, na forma de grão, na dieta de novilhas
395 da raça Holandês aumentou a quantidade de ácidos graxos totais e a quantidade de ácidos
396 graxos poli-insaturados, tais como, os ácidos: linoleico (C18:2n6) e linolênico (C18:3n3)
397 no plasma e no líquido folicular.

398

399 **Referências**

400

401 Albuquerque, K.P., Do Prado, I.N., Cavalieri, F.L.B., Rigolon, L.P., Do Prado,
402 R.M., Pizzi Rotta, P. 2009. Fatty acid composition in blood plasma and follicular
403 liquid in cows supplemented with linseed or canola grains. *Asian-Australasian Journal*
404 *of Animal Sciences*. 22 (9), 1248-1255. <https://doi.org/10.5713/ajas.2009.80568>.

405 Alves, J.P.M., Fernandes-Calderon, C.E.M., Rosseto, R., Bertolini, M., Rondina, D.
406 2021. Short-term supplementation of diets rich in lipids or glycogen precursors can
407 affect intra-follicular environment, oocyte mitochondrial gene expression, and
408 embryo development following parthenogenesis in goat. *Small Ruminant Research*.
409 194, 106-279. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106279>.

410 Ambrose, D.J., Kastelic, J.P., Corbett, R., Pitney, P.A., Petit, H.V., Small, J.A.,
411 Zalkovic, P. 2006. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet

412 enriched in alpha-linolenic acid. *Journal of Dairy Science*. 89 (8), 3066-
413 3074. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72581-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72581-4).

414 Bett, V., Santos, G.T.D., Aroeira, L.J.M., Petit, H.V., Dias, P.G., Leggi, T.C.D.S.S.,
415 Zeoula, L.M. 1999. Desempenho e digestibilidade in vivo de cordeiros alimentados
416 com dietas contendo canola em grão integral em diferentes formas. *Revista*
417 *Brasileira de Zootecnia*. 28, 808-815. [https://doi.org/10.1590/S1516-](https://doi.org/10.1590/S1516-35981999000400022)
418 [35981999000400022](https://doi.org/10.1590/S1516-35981999000400022).

419 Bilby, T.R., Block, J., Do Amaral, B.C., Sa Filho, O., Silvestre, F.T., Hansen,
420 P.J., Thatcher, W.W. 2006. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte
421 quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. *Journal of*
422 *Dairy Science*. 89 (10), 3891-3903. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72432-8)
423 [0302\(06\)72432-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72432-8).

424 Bligh, E.G.; dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and
425 purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37 (8), 911-917.

426 Childs, S., Hennessy, A.A., Sreenan, J.M., Wathes, D.C., Cheng, Z., Stanton, C.,
427 Kenny, D.A. 2008. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid
428 supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected
429 reproductive variables in cattle. *Theriogenology*. 70 (4), 595-
430 611. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.002>.

431 De Sousa, S.V. 2022. Lipídios em dietas para ruminantes e seus efeitos sobre a
432 qualidade da carne. *Veterinária e Zootecnia*, 29, 1-12.

433 Eifert, E.D.C., Lana, R.D.P., Lanna, D.P.D., Teixeira, R.M.A., Arcuri, P.B., Leão,
434 M.I., Valadares Filho, S.D.C. 2006. Perfil de ácidos graxos e conteúdo de ácido
435 linoléico conjugado no leite de vacas alimentadas com a combinação de óleo de soja
436 e fontes de carboidratos na dieta. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 1829-1837.
437 <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000600034>.

438 Elis, S., Freret, S., Desmarchais, A., Maillard, V., Cognié, J., Briant, E., Touzé, J.L.,
439 Dupont, M., Faverdin, P., Chajes, V., Uzbeko, V.A.S., Monget, P., Dupont, J. 2016.
440 Effect of along chain n-3 PUFA-enriched diet on production and reproduction
441 variables in Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 164, 121-132.
442 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.020>.

443 Farahmandfar, R., Asnaashari, M., Sayyad, R. 2015. Comparison antioxidant
444 activity of TaromMahali rice bran extracted from different extraction methods and

445 its effect on canola oil stabilization. *Journal of Food Science and Technology*. 52,
446 6385-6394.

447 Fontes, P.L., Henry, D.D., Ciriaco, F.M., Oosthuizen, N., Cooke, R.F., Mercadante,
448 V.R., Lamb, G.C. 2019. Effects of polyunsaturated fatty acids supplementation on
449 reproductive parameters associated with the performance of suckled beef cows.
450 *Animal*.13 (2), 349-357. <https://doi.org/10.1017/S175173111800143X>.

451 Freret, S., Oseikria, M., Le Bourhis, D., Desmarchais, A., Briant, E., Desnoes, O.,
452 Elis, S. 2019. Effects of a n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet on embryo
453 production in dairy cows. *Reproduction*.158, 71-83. [https://doi.org/10.1530/REP-18-](https://doi.org/10.1530/REP-18-0644)
454 0644.

455 Ginther, O.J., Kot, K., Kulick, L.J., Wiltbank, M.C. 1997. Sampling follicular fluid
456 without altering follicular status in cattle: o estradiol concentrations early in a
457 follicular wave. *Reproduction*, 109 (2), 181-186.

458 International Organization for Standardization. 1978. EN ISO 5509: Animal and
459 vegetable fats and oils preparation of methyl esters of fatty acids. London: ISSO.

460 Mansbridge, R.J., Blake, J.S. 1997. Nutritional factors affecting the fatty acid
461 composition of bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 78, S37-S47.
462 <https://doi.org/10.1079/BJN19970133>.

463 Mattos, R., Staples, C. R., Arteche, A., Wiltbank, M. C., Diaz, F. J., Jenkins, T. C.,
464 & Thatcher, W. W. (2004). The effects of feeding fish oil on uterine secretion of
465 PGF 2α , milk composition, and metabolic status of periparturient Holstein
466 cows. *Journal of Dairy Science*, 87 (4), 921-932. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73236-1)
467 0302(04)73236-1.

468 Moallem, U. 2018. Invited review: Roles of dietary n-3 fatty acids in performance,
469 milk fat composition, and reproductive and immune systems in dairy cattle. *Journal*
470 *of Dairy Science*. 101 (10), 8641-8661. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14772>.

471 Moallem, U., Shafran, A., Zachut, M., Dekel, I., Portnick, Y., Arieli, A. 2013.
472 Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil improved folliculogenesis and IVF
473 performance in dairy cows, similar to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids
474 from fish oil. *Reproduction*. 146 (6), 603-614.

475 National Research Council. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 2001. 7^{ed}.
476 Washington: National Academy Press, 381p.

- 477 Oliveira, S.G., Simas, J.M.C., Santos, F.A.P. 2004. Principais aspectos relacionados
478 às alterações no perfil de ácidos graxos na gordura do leite de ruminantes. Archives
479 of Veterinary Science. 9, 73-80.
- 480 Palmquist, L.D, Mattos, W.R.S. 2011. Metabolismo de Lipídios. In: Berchielli TT,
481 Pires AV, Queiroz, M.F.S; Berchielli, T.T; Moraes, J.A.S. Digestibilidade e
482 parâmetros ruminais de bovinos consumindo *Brachiaria Brizantha* cv. Marandu.
483 Archives. Zootecnia. 60 (232), 997-1008.
- 484 Petit, H.V. 2002. Digestion, milk production, milk composition, and blood
485 composition of dairy cows fed whole flaxseed. Journal Dairy Science. 85 (6), 1482-
486 1490. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74217-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74217-3).
- 487 Ponter, A.A., Guyader-Joly, C., Nuttinck, F., Grimard, B., Humblot, P. 2012. Oocyte
488 and embryo production and quality after OPU-IVF in dairy heifers given diets
489 varying in their n-6/n-3 fatty acid ratio. Theriogenology. 78 (3), 632-645.
490 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.009>.
- 491 Robinson, R.S., Pushpakumara, P.G.A., Cheng, Z., Peters, A.R., Abayasekara,
492 D.R.E.
- 493 Wathes, D.C. 2002. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and
494 uterine function in lactating dairy cows. Reproduction. 124, 119-131.
- 495 Statistical Analyses System. SAS® OnDemand for Academics, 2024 (on-line).
- 496 Scaliante-Júnior, J.R. 2021. Perfil plasmático de ácidos graxos e taxa de concepção
497 em vaca Nelore suplementadas com semente de girassol. Tese - Unesp. Araçatuba.
498 <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/202786>.
- 499 Sinedino, L.D., Honda, P.M., Souza, L.R., Lock, A.L., Boland, M.P., Staples, C.R.,
500 Santos, J.E. 2017. Effects of supplementation with docosaheptaenoic acid on
501 reproduction of dairy cows. Reproduction. 153 (5), 707-723.
- 502 Staples, C.R., Burke, J.M., Thatcher, W.W. 1998. Influence of Supplemental Fats
503 on Reproductive Tissues and Performance of Lactating Cows. Journal of Dairy
504 Science. 81 (3), 856-871.
- 505 Van Soest, P. V., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber,
506 neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition.
507 Journal of Dairy Science, 74 (10), 3583-3597.
- 508 Wildman, O.E.E., Jones, G.M., Wagner, P.E. 1982. A dairy cow body condition
509 scoring system and its relationship to selected production characteristics. Journal of
510 Dairy Science. 65 (3), 495-501. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82223-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82223-6).

511 Zeng, X., Li, S., Liu, L., Cai, S., Ye, Q., Xue, B., Zeng, X. 2023. Role of functional
512 fatty acids in modulation of reproductive potential in livestock. *Journal of Animal*
513 *Science and Biotechnology*, 14 (24), 2- 19. 10.1186/s40104-022-00818-9.

1 Artigo IV – Avaliação do número de oócitos em novilhas doadoras da raça
2 Holandês a partir da inclusão de grão de canola na dieta

3
4 RESUMO
5

6 Objetivou-se neste estudo avaliar o efeito da inclusão de canola em grão, na produção *in*
7 *vitro* de embriões em novilhas da raça Holandês. O estudo foi conduzido na Fazenda
8 Várzea Grande, Floresta, Paraná e no Biotec - Unicesumar em Maringá, Paraná. Foram
9 utilizados 16 animais divididos aleatoriamente em dois tratamentos: T1- Controle (n=8)
10 e T2- Canola (n=8). As dietas foram fornecidas, duas vezes ao dia pelo período de 100
11 dias, sendo que, a partir do 23º dia, os animais foram submetidos ao processo de aspiração
12 folicular e produção *in vitro* de embriões, totalizando 04 sessões de aspiração com
13 intervalo médio de 25 dias. Na terceira sessão de aspiração os animais foram submetidos
14 ao protocolo de sincronização do estro e oito dias após foi avaliado o número de folículos
15 totais, tamanho do folículo dominante, tamanho do corpo lúteo e colheita de sangue para
16 análise dos parâmetros bioquímicos. As variáveis foram analisadas pelo
17 procedimento PROC GLM do programa estatístico SAS® OnDemand for Academics
18 (2024). As médias foram analisadas pelo método das médias dos quadrados mínimos
19 (*LeastSquaresMeans - LSM*). Os animais alimentados com canola em grão apresentaram
20 aumento ($p < 0,05$), a partir da terceira sessão de aspiração, no número de oócito totais,
21 viáveis e inviáveis ($p < 0,0001$), bem como o número de embriões clivados ($p < 0,0001$) e
22 de embriões totais ($p < 0,0126$). Contudo, não houve efeito sobre a taxa de clivagem e a
23 taxa de embriões produzidos ($p > 0,05$), assim, os animais alimentados com canola em grão
24 apresentaram aumento no número de folículos totais disponível para aspiração, sem
25 alterar o tamanho do folículo dominante e do corpo lúteo. Conclui-se que, novilhas da
26 raça Holandês alimentadas com canola em grão apresenta aumento no número de
27 folículos totais e na produção de embriões *in vitro*.

28
29 **Palavras-chave:** Ácidos graxos poli-insaturados; biotecnologia da reprodução animal;
30 colza; embriões; fertilização *in vitro*.

31

32

33

34

35 ABSTRACT

36

37 The objective of this study was to evaluate the effect of including canola grain on the in
38 vitro production of embryos in Holstein heifers. The study was conducted at Fazenda
39 Várzea Grande, Floresta, Paraná and at Biotec - Unicesumar in Maringá, Paraná. A total
40 of 16 animals were used, randomly divided into two treatments: T1- Control (n=8) and
41 T2- Canola (n=8). The diets were provided twice a day for a period of 100 days, and from
42 the 23rd day onwards, the animals were subjected to the process of follicular aspiration
43 and in vitro production of embryos, totaling 04 aspiration sessions with an average
44 interval of 25 days. In the third aspiration session, the animals were subjected to the estrus
45 synchronization protocol and eight days later the number of total follicles, size of the
46 dominant follicle, size of the corpus luteum and blood collection were evaluated for
47 analysis of biochemical parameters. The variables were analyzed using the PROC GLM
48 procedure of the statistical program SAS® OnDemand for Academics (2024). The means
49 were analyzed using the least squares method (LeastSquaresMeans - LSM). Animals fed
50 with canola grain showed an increase ($p<0.05$), from the third aspiration session, in the
51 number of total, viable and non-viable oocytes ($p<0.0001$), as well as the number of
52 cleaved embryos ($p<0.0001$) and total embryos ($p<0.0126$). However, there was no effect
53 on the cleavage rate and the rate of embryos produced ($p>0.05$), as well, animals fed with
54 canola grain showed an increase in the number of total follicles available for aspiration,
55 without changing the size dominant follicle and corpus luteum. It is concluded that
56 Holstein heifers fed with canola grain show an increase in the number of total follicles
57 and in vitro production of embryos.

58

59 Keywords: Polyunsaturated fatty acids; Biotechnology of animal reproduction; rapeseed;
60 embryos; in vitro fertilization.

61

62

63

64

65 1. Introdução

66 A produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos tem sido uma das principais
67 técnicas utilizadas em muitas regiões do mundo para aumentar o número de descendentes
68 de um animal geneticamente superior. O Brasil é considerado um dos maiores produtores
69 mundiais de embriões bovinos produzidos *in vitro*. A técnica quando utilizada no rebanho
70 leiteiro, além de contribuir para o ganho genético da propriedade, ainda permite a
71 utilização de sêmen sexado de fêmea, aprimorando ainda mais a rentabilidade da
72 propriedade leiteira.

73 Vários fatores determinam o sucesso da técnica e os resultados na propriedade
74 leiteira, tais como: o estágio de lactação, o escore de condição corporal, a temperatura
75 ambiente, o nível de produção e a nutrição das doadoras. Dentre os fatores nutricionais, a
76 adição de gordura na dieta, mais precisamente AGPI (ácidos graxos poli-insaturados),
77 vem ganhando destaque nas últimas décadas e trabalhos recentes têm demonstrado que a
78 adição de AGPI na dieta de ruminantes melhora a qualidade oocitária (Freret *et al.*, 2019),
79 aumenta o desempenho reprodutivo (Sinedino *et al.*, 2017; Moalem 2018; Fontes *et al.*,
80 2019), melhora a produção de blastocistos viáveis (Alves, 2021), aumenta número de
81 folículos grandes (Robinson *et al.*, 2002; Ambrose *et al.*, 2006; Bilby *et al.*, 2006),
82 diminuição na mortalidade embrionária (Elis *et al.*, 2016) e aumento da concentração
83 circulante hormônios esteroides (Staples *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 2002; Childs *et al.*, 2008;
84 Scaliante-Junior, 2021). Todavia, os efeitos benéficos da inclusão de AGPI na dieta dos
85 animais ruminantes na produção de embriões parecem estar relacionados com a fonte de
86 gordura utilizada, da quantidade fornecida, do tempo de fornecimento, do perfil de ácido
87 graxo (AG) e do método de proteção da fonte utilizada (Moallem *et al.*, 2018).

88 Dentre as fontes de gorduras disponíveis a canola (*Brassica napus L.*) em grão
89 pode se destacar por apresentar uma cápsula rígida, que confere uma proteção natural ao
90 processo de biohidrogenação ruminal, e além do mais, a produção é favorecida por ser
91 uma cultura de inverno, não competindo com as culturas tradicionais de verão como a
92 soja e o milho. É considerado um alimento proteico que possui de 23 a 25,5% de proteína
93 bruta na matéria seca, além de apresentar altos teores de óleo, que variam de 30 a 50%
94 nas sementes, que possuem AGPI como o oleico, linoleico e linolênico (Oliveira, 2017).

95 Albuquerque *et al.* (2005) avaliaram vacas Nelore suplementadas com grãos de
96 linhaça e canola, ricos em AGPI, durante 80 dias, e observaram aumento nas

97 concentrações dos ácidos graxos linoleico e linolênico no líquido folicular e melhora na
98 produção de *in vitro* de embriões viáveis.

99 Contudo, ainda são necessárias mais pesquisas a fim de entender a relação entre a
100 inclusão de canola em grão na alimentação de vacas de leite e a eficiência da *ovum pick-*
101 *up* (OPU) e da produção *in vitro* de embriões. Desse modo, objetivou-se neste trabalho
102 verificar o efeito da inclusão de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês e
103 seu efeito na produção *in vitro* de embriões, e metabólitos sanguíneos.

104

105 **2. Material e métodos**

106

107 *2.1 Declaração de Ética*

108

109 O projeto foi aprovado pelo CEUA - Comitê de Ética no uso de Animais da
110 Universidade Cesumar/ Unicesumar, em Maringá, Paraná (parecer 02.2/2023).

111

112 *2.2 Local e Instalações*

113

114 O experimento a campo foi realizado na Fazenda Várzea Grande, localizada na
115 cidade de Floresta, Paraná, Brasil (23°37'15.5"S, 52°04'55.8" W) entre os meses de
116 março de 2022 a novembro de 2022. As produções *in vitro* de embriões ocorreram no
117 mesmo período e foram realizadas no Laboratório Bio-Maringá localizado na Fazenda
118 Experimental UniCesumar (23°25'S, 51°57'W e altitude de 550 metros).

119

120 *2.3 Animais e Dietas*

121

122 Foram utilizadas 16 novilhas da raça Holandês (*Bos taurus taurus*), com peso médio
123 de 350 Kg, idade variando entre 12 e 15 meses, escore de condição corporal (ECC) entre
124 3,0 e 3,5, em uma escala de 1 e 5 (Wildman *et al.*,1982).

125 Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos com 08 animais
 126 cada: T1 - Controle e T2 - Canola, foram alojados de acordo com cada tratamento, em
 127 baias coletivas, com 20 m² por animal e 8,0 metros de linha de cocho. As dietas foram
 128 formuladas de acordo com as exigências nutricionais do *NationalResearchCouncil* (NRC,
 129 2001) para gado de leite considerando novilhas da raça Holandês, com 340 kg de peso
 130 vivo (PV) e ganho de peso médio diário de 700 gramas. Foram fornecidos 2,2% do PV
 131 em matéria seca (MS), que proporcionou o consumo médio, por tratamento, de 6,50 Kg
 132 de MS/animal/dia, composto por 4,73 kg de MS oriundo de silagem de milho e 1,77 kg
 133 de concentrado MS/animal/dia, oriundo das dietas experimentais (Tabela 1) pelo período
 134 de 100 dias.

135

136 Tabela 1- Composição (Kg/MS) das dietas experimentais

| Ingredientes | Dietas experimentais (Kg/MS) | |
|------------------------|------------------------------|------------|
| | T1 - Controle | T2 –Canola |
| Silagem de milho | 4,73 | 4,73 |
| Milho grão moído | 1,17 | 0,77 |
| Farelo de Soja | 0,54 | 0,34 |
| Canola em grão | - | 0,60 |
| Bovigold | 0,06 | 0,06 |
| Total | 6,50 | 6,50 |
| Composição química (%) | | |
| EE | 2,33 | 4,05 |
| NDT | 67,18 | 68,89 |
| PB | 10,22 | 9,94 |
| FDN | 42,16 | 43,98 |
| FDA | 23,66 | 25,08 |
| Ca | 0,38 | 0,27 |
| P | 0,11 | 0,10 |

137 * Suplemento mineral e vitamínico, composição por kg do produto: Fluor, 600,00 mg; Vit E 2,400 UI; Vit
 138 D3 100.000 UI; Vit A 400.000 UI; Zinco 2.500 mg; Selênio 19,00 mg; Manganês 1.600 mg; Iodo 40,00 mg;
 139 Ferro 700,00 mg; Cromo 10,00 mg; Cobre 700,00 mg; Cobalto 15,00 mg; Sódio 70,00 g; Potássio 35,00 g;
 140 Magnésio 20,00 g; Enxofre 20,00 g; Fósforo 60,00 g; Cálcio máx. 220,00 g; Cálcio min. 190,00 g.

141

142 Os dados para determinação do consumo de MS e nutrientes foram obtidos através
 143 dos registros dos alimentos oferecidos e sobras, diariamente, durante todos os dias do
 144 período experimental. As amostras das dietas foram coletadas semanalmente e congeladas
 145 a -10°C e ao final de cada mês foram descongeladas, compostas por tratamento e foi

146 retirada uma alíquota de aproximadamente 600 gramas. As alíquotas foram secas em
147 estufas de ventilação forçada (55 a 60°C) por 72 h para determinação da matéria seca de
148 acordo com a AOAC (1990) e moídas em moinho da marca Willei com peneiras de
149 1 mm.

150 As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Análises de
151 Alimentos da Universidade Estadual de Maringá (UEM). A determinação de MS, proteína
152 bruta (PB), extrato etéreo (EE), cinzas, cálcio e fósforo foram determinados de acordo
153 com Silva (1981) e as determinações de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em
154 detergente ácido (FDA) foram realizadas seguindo a metodologia de Van Soest (1991).

155 As dietas experimentais foram analisadas quanto à composição de AG (Tabela 2).
156 Para tanto, a gordura nas amostras das dietas foi separada conforme descrito por Bligh;
157 Dyer (1959) e os AG foram metilados de acordo com o método 5509 da ISO (ISSO, 1978)
158 usando KOH/metanol (Synth, São Paulo, Brasil) e n-heptano (Vetec, Rio de Janeiro, RJ,
159 Brasil). Os ésteres metílicos de AGs foram quantificados por cromatografia gasosa (Trace
160 GC Ultra, *Termo Scientific, West Palm Beach*, Flórida, EUA) equipada com amostrador
161 automático, com ionização por chama e uma coluna capilar de sílica fundida Rt-2560
162 (100 m e 0,25 mm i.d., espessura de filme de 0,20 µm). Os parâmetros da coluna foram
163 os seguintes: a temperatura inicial da coluna de 65 °C foi mantida por 8 min; a
164 temperatura foi então programada em 10 °C/ min até 210 °C; esta temperatura foi mantida
165 por 10 min e então aumentada 5 °C/ min até 240 °C e permaneceu por 8 min. As
166 temperaturas do injetor e do detector foram de 240 e 250 °C, respectivamente. O fluxo de
167 gás foi de 45 mL/ min para hidrogênio (gás de arraste), 45 mL/min para N₂ (gás auxiliar),
168 45 mL/ min para H₂ e 400 mL/ min para ar comprimido. Os picos de AGs foram
169 identificados usando o padrão de éster metílico puro F. A. M. E 18919 (Sigma Aldrich,
170 São Paulo, SP, Brasil).

171

172

173

174

175

176

177 Tabela 2. Composição de ácidos graxos das dietas experimentais (%)

| Ácido graxo (%) | T1 | T2 |
|---------------------------------|--------|--------|
| Octanoico (C8) | 0,025 | 0,005 |
| Cáprico (C10:0) | 0,013 | 0,000 |
| Undecanoico (C11:0) | 0,030 | 0,015 |
| Láurico (C12:0) | 0,283 | 0,113 |
| Tridecanoico (13:0) | 0,035 | 0,015 |
| Mirístico (C14:0) | 0,468 | 0,225 |
| Miristoleico (C14:1) | 0,055 | 0,015 |
| Pentadecanoico (C15:0) | 0,058 | 0,053 |
| Pentadecenoico (C15:1) | 0,023 | 0,018 |
| Palmítico (C16:0) | 20,205 | 10,605 |
| Palmitoleico (C16:1) | 0,615 | 0,373 |
| Heptadecanoico (C17:0) | 0,315 | 0,145 |
| Heptadecanoico cis 10 (C17:1) | 0,088 | 0,090 |
| Estearico (C18:0) | 3,790 | 2,583 |
| Oleico (C18:1n9c) | 35,400 | 49,550 |
| Linoleico (C18:2n6c) | 29,848 | 27,418 |
| α - linolênico (C18:3n3) | 3,655 | 5,103 |
| Gadoleico (C20:1) | 0,670 | 0,928 |
| Eicosadienoico (C20:2) | 0,050 | 0,058 |
| Eicosatrienoico (C20:3) | 0,015 | 0,005 |
| Behênico (C22:0) | 0,678 | 0,485 |
| Tetradecenoico cis -13- (C22:1) | 0,453 | 0,313 |
| Docosadienoico (C22:2n6) | 0,068 | 0,010 |
| Tricosanoico (C23:0) | 0,493 | 0,108 |
| Tetracosanoico (C24:0) | 0,750 | 0,498 |
| Lignoceroleico (C24:1) | 0,033 | 0,230 |
| Ácidos graxos saturados (AGS) | 27,203 | 14,905 |
| Ácidos graxos insaturados (AGI) | 70,995 | 84,108 |
| Ómega 6 (n-6) | 29,848 | 27,418 |
| Ómega 3 (n-3) | 3,753 | 5,118 |
| n-6/n-3 | 8,015 | 5,333 |
| Outros | 1,828 | 0,987 |

178

179 *2.4 Delineamento Experimental*

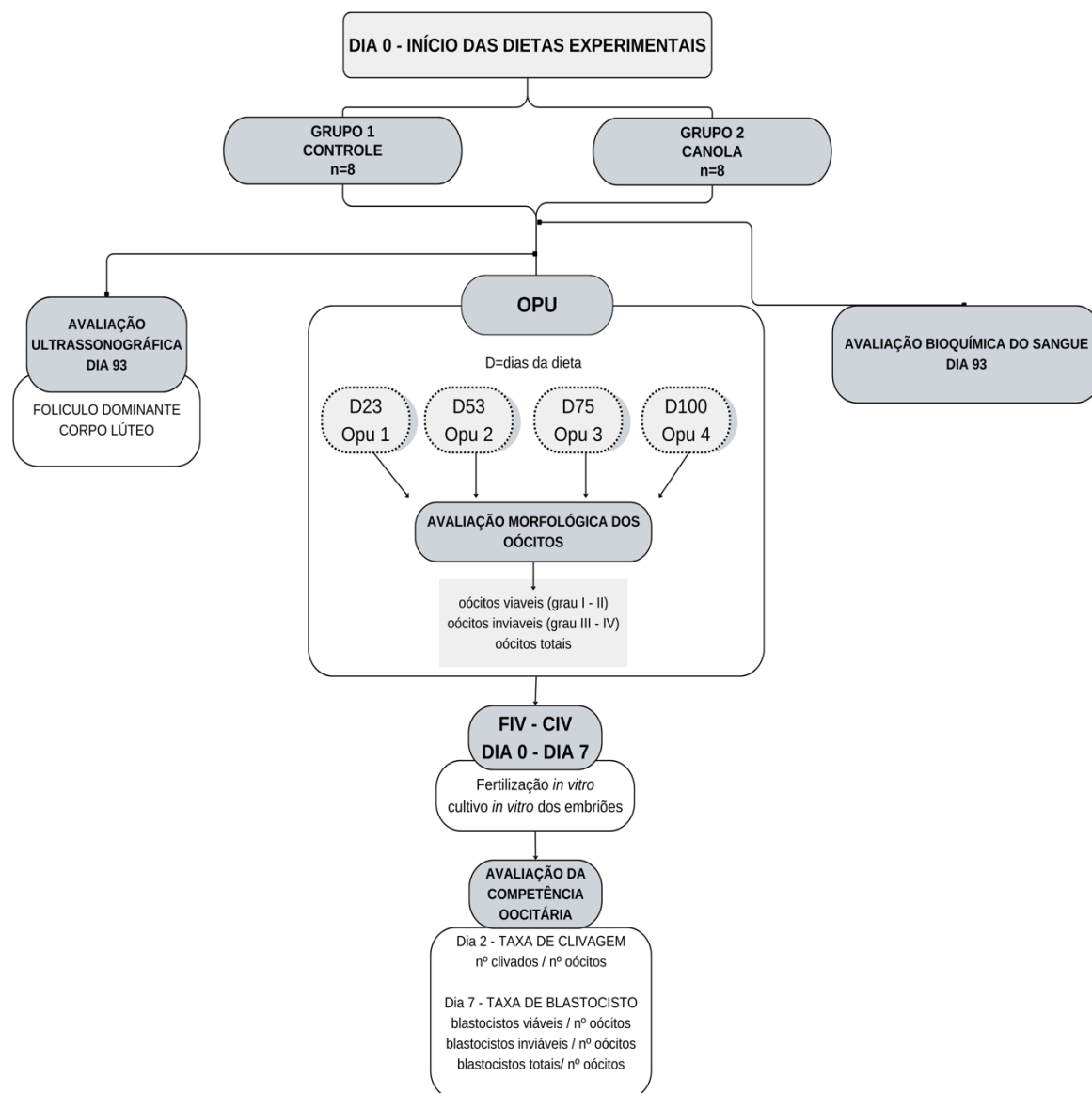
180

181 O período de suplementação com as dietas experimentais foi de 100 dias. O
182 Delineamento foi inteiramente ao acaso, com o número de tratamentos conforme a
183 repetição (quatro sessões de aspiração folicular) com intervalo médio de 25 dias. As

184 características estudadas foram: taxa de recuperação oocitária, número de oócitos viáveis,
 185 inviáveis e totais, taxa de clivagem e taxa de blastocisto (Figura 1).

186 Figura 1. Esquema experimental

187



188

189 Figura 1. Esquema experimental

190 OPU – OvumPickup (aspiração folicular)

191 CIV – Cultivo *in vitro* de embriões

192

193

194

195 *2.5 Aspiração Folicular - OPU*

196

197 O procedimento de aspiração folicular e recuperação dos oócitos foi realizado
198 utilizando o ultrassom ALOKA SSD-500 com transdutor microconvexo de 5 mHz (UST
199 974-5), ajustado a uma guia de aspiração folicular específica para sistema reprodutor de
200 bovinos. Foi utilizada agulha 20G conectada a um tubo de Falcon de 50 mL através de
201 um sistema de aspiração (Cook VBOA 18L[®]). A pressão de vácuo foi obtida por uma
202 bomba Cook V-MAR 5000, ajustada entre 38 e 45 mmHg, permitindo um fluxo de 12 mL
203 de meio/minuto.

204 Os animais foram submetidos à anestesia peridural baixa com 5 mL de lidocaína
205 a 2% (Pearson[®]) e logo após a vulva foi lavada e limpa com papel toalha. Na sequência,
206 foi inserido o transdutor microconvexo de 5 mHz (UST 974-5) até o fundo de saco vaginal
207 e, com a manipulação dos ovários através do reto, buscou-se a melhor visualização dos
208 mesmos na tela do ultrassom.

209 Logo após, os folículos foram posicionados na linha de punção indicada na tela
210 do ultrassom e aspirados através da agulha e da bomba de vácuo, para uma solução
211 contendo 25 UI/mL de heparina sódica e 98,0% de PBS (Nutricell[®]). Ao término da
212 aspiração o sistema de vácuo foi limpo com o meio de recebimento dos oócitos e as
213 agulhas utilizadas foram descartadas. Para a lavagem e seleção dos oócitos, o material
214 aspirado foi transferido para o filtro de colheita de embriões e lavado com o mesmo meio
215 utilizado para aspiração. Os sedimentos restantes no filtro foram transferidos para placa
216 de Petri e foi realizada a busca, contagem e classificação dos oócitos, como totais, viáveis
217 e inviáveis, sendo considerados viáveis aqueles que apresentarem a presença de cúmulos
218 e ooplasma homogêneos, e inviáveis aqueles desnudos ou picnóticos, heterogêneos e com
219 vesículas apoptóticas (De Loos *et al.*, 1989).

220 Os oócitos selecionados foram lavados em TCM199 suplementado com Hapes e
221 colocados em tubos de ensaios com meio de maturação TCM199 com sais de Earles
222 (Gibco[®]), glutamina (Sigma[®] cod: G8540) e NaHCO₃ (Mallinckrodt[®]), suplementado
223 com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab[®]), 22 µg/mL piruvato (Biochemical[®] cod:
224 44094), 50 µg/mL de gentamicina (Sigma[®] cod: G1272), 0,5 µg de FSH/mL (Bioniche[®]),
225 50 µg de LH/mL (Bioniche[®]) e 1 µg de estradiol/mL (Sigma[®] cod: E2758) e gaseificados

226 por 30 segundos com mistura especial (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂), os tubos de
227 ensaio foram lacrados e em seguida colocados em um transportador de oócitos a 38,5°C,
228 e levados até o laboratório de PIVE, os mesmo permaneceram nos tubos maturando por
229 22-24 h.

230

231 2.6 Produção *In Vitro* de Embriões

232

233 A produção dos embriões foi realizada no laboratório comercial de biotecnologia
234 da reprodução animal (BIO-Maringá). Após a maturação dos oócitos os 2 grupos
235 experimentais foram submetidos à fecundação *in vitro* utilizando o meio TALP
236 suplementado com 10 µg/mL de heparina (Sigma[®]cod: H3149), 22 µL/mL de piruvato
237 (Biochemical[®]cod: 44094), 50 µg/mL de gentamicina (Sigma[®] cod: G1272), albumina
238 sérica bovina-BSA (sem ácidos graxos) (Sigma[®] cod: A3311), solução de PHE (2 µM de
239 penicilina (Sigma[®]cod: P4875), 1 µM de hipotaurina (Sigma[®] cod: H1384) e 0,25 µM de
240 epinefrina (Sigma[®]cod: E4250). Os oócitos maturados foram transferidos para micro-
241 gotas de meio de fertilização (20 oócitos/gotas) para serem fertilizados. O sêmen utilizado
242 foi sexado de fêmea da raça Holandês (*Bos taurus*) e descongelado em banho-maria a
243 36 °C. Para seleção dos espermatozoides móveis e remoção de diluidores e de plasma
244 seminal, foi realizada a centrifugação em gradiente Percoll (90% e 45%), durante 4
245 minutos. A dose de inseminação foi de 1x10⁶ espermatozoides/mL, e permaneceram por
246 22-24 h, a 38,5 °C, em atmosfera com 5% de CO₂ e umidade máxima.

247 Após a fertilização os zigotos foram cultivados *in vitro* (CIV), no meio SOF
248 (*SyntheticOviductFluid*) suplementado com 1,0% de SFB (Cultilab[®]), permanecendo em
249 atmosfera fechada em mistura especial com três gases CO₂/N₂/O₂. Após 48 h foi avaliada
250 a taxa de clivagem (nº clivados/ nº oócitos). Nesse momento foi observado o
251 desenvolvimento embrionário com duas, quatro e oito células. Em seguida, os embriões
252 foram recolocados em atmosfera fechada para a continuidade do desenvolvimento.

253 No dia 4 (D4) os embriões passaram pela troca do meio de cultivo preparado no dia
254 em questão, sendo retirados 50 µL do meio de cada gota e, em seguida, repondo com um
255 novo meio de cultivo.

256 No dia 7 (D7) foi avaliada a taxa de embriões que chegaram a blastocisto (nº de
257 blastocistos grau I - II / nº oócitos). Foram considerados blastocistos de grau I as estruturas

258 de qualidade boa ou excelente, ou seja, com poucos blastômeros danificados, tendo no
259 máximo 15% de células extrusadas da massa celular do embrião, já os blastocistos de
260 grau II, as células extrusadas da massa celular do embrião compreende mais de 15% do
261 material celular, segundo os critérios de avaliação do Manual da Sociedade Internacional
262 de Transferência de Embriões (IETS, 2013).

263

264 *2.7 Caracterização das Estruturas Ovarianas e Parâmetros Bioquímicos*

265

266 Na terceira sessão de aspiração, no dia dez (D10) do ciclo estral as fêmeas foram
267 submetidas a um protocolo farmacológico para a sincronização da ovulação, baseado na
268 aplicação intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol e introdução de um dispositivo
269 intravaginal de progesterona (CIDR 1,9 g – Zoetis). No D-3 este dispositivo foi removido
270 e foram aplicados 150 µg de D-cloprostenol de sódio, 300 UI de gonadotrofina coriônica
271 equina e 1,0 mg de cipionato de estradiol por via intramuscular.

272 O dia zero (D0), 48 h após a remoção do dispositivo de progesterona, foi
273 considerado dia da ovulação e oito dias após o dia da ovulação e 93 dias (D93) das dietas
274 experimentais foi realizada a avaliação ultrassonográfica dos pares ovarianos de cada
275 doadora, na qual foi registrada a presença ou ausência de folículo dominante e do corpo
276 lúteo (CL) e mensurado o diâmetro destas estruturas. Neste momento, também foi
277 coletado sangue através da punção da veia caudal em tubos vacutainer (Becton, Dickinson
278 and Company; BD) contendo 2% de EDTA. Foram coletados aproximadamente 10 mL
279 de sangue/animal/dia. O sangue foi centrifugado a 2.500 g durante 20 min. Após a
280 centrifugação, o plasma foi removido e acondicionado em microtubos de 1,5 mL. As
281 amostras de plasma foram armazenadas a -80 °C, para analisar a concentração de ALT,
282 creatina, FA, ureia, colesterol total e triglicérido.

283

284 *2.8 Análises Estatísticas*

285

286 As variáveis foram analisadas pelo procedimento *PROC GLM* do programa
287 estatístico SAS[®] OnDemand for Academics (2024). As médias foram analisadas pelo
288 método das médias dos quadrados mínimos (*LeastSquaresMeans - LSM*).

289 **3. Resultados**
290

291 O fornecimento de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês aumentou
292 ($p < 0,05$) o número de oócitos totais, viáveis e inviáveis, bem como, o número de embriões
293 clivados e blastocistos, contudo, não houve efeito sobre a taxa de clivagem e a taxa de
294 embriões ($p > 0,05$) (Tabela 3). Com relação a produção de embriões, pode-se verificar
295 que os animais alimentados com canola em grão apresentaram aumento na quantidade de
296 embriões clivados, número de blastocistos e a taxa de blastocisto, isto a partir da terceira
297 sessão de aspiração, ou seja, 75 dias de fornecimento da canola na dieta.

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315 Tabela 3. Eficiência da *ovum pick-up* (OPU) e da produção *in vitro* de embriões de
 316 novilhas Holandês alimentadas sem canola em grão (T1) e com canola em grão (T2)

| OPU 01 | | | | |
|---------------------------|----------|--------------------|--------------|-------------------|
| Variáveis | N | Tratamentos | | Valor de P |
| | | T1 | T2 | |
| Número de oócitos totais | 16 | 10,75 ± 1,15 | 11,75 ± 1,21 | 0,5510 |
| Número de oócitos viáveis | 16 | 6,87 ± 0,92 | 8,87 ± 1,05 | 0,1540 |
| Número de clivados | 16 | 3,50 ± 0,66 | 4,25 ± 0,72 | 0,4461 |
| Taxa de clivagem (%) | 16 | 54,25 ± 2,78 | 51,19 ± 2,52 | 0,4148 |
| OPU 02 | | | | |
| Variáveis | N | Tratamentos | | Valor de P |
| | | T1 | T2 | |
| Número de oócitos totais | 16 | 9,75 ± 1,10 | 16,50 ± 1,43 | 0,0002 |
| Número de oócitos viáveis | 16 | 7,25 ± 0,95 | 9,25 ± 1,07 | 0,1637 |
| Taxa de oócitos viáveis | 16 | 76,25 ± 3,30 | 58,75 ± 2,71 | <,0001 |
| Número de clivados | 16 | 4,50 ± 0,75 | 5,87 ± 0,85 | 0,2273 |
| Taxa de clivagem (%) | 16 | 66,97 ± 3,09 | 77,18 ± 3,10 | 0,0199 |
| Número de embriões | 16 | 1,25 ± 0,39 | 1,37 ± 0,41 | 0,8273 |
| Taxa de embriões (%) | 16 | 19,1 ± 1,65 | 17,69 ± 1,48 | 0,5062 |
| OPU 03 | | | | |
| Variáveis | N | Tratamentos | | Valor de P |
| | | T1 | T2 | |
| Número de oócitos totais | 16 | 9,62 ± 1,09 | 1,37 ± 1,47 | <0,0001 |
| Número de oócitos viáveis | 16 | 7,00 ± 0,93 | 13,75 ± 1,31 | <0,0001 |
| Taxa de oócitos viáveis | 16 | 68,19 ± 2,91 | 78,87 ± 3,14 | 0,0127 |
| Número de clivados | 16 | 4,37 ± 0,73 | 8,75 ± 1,04 | 0,0006 |
| Taxa de clivagem (%) | 16 | 69,02 ± 2,93 | 66,05 ± 2,87 | 0,4696 |
| Número de embriões | 16 | 0,87 ± 0,33 | 2,25 ± 0,53 | 0,0278 |
| Taxa de embriões (%) | 16 | 8,75 ± 1,04 | 15,07 ± 1,37 | 0,0002 |
| OPU 04 | | | | |
| Variáveis | N | Tratamentos | | Valor de P |
| | | T1 | T2 | |
| Número de oócitos totais | 16 | 9,37 ± 1,08 | 15,00 ± 1,36 | 0,0013 |
| Número de oócitos viáveis | 16 | 4,62 ± 0,76 | 8,62 ± 1,03 | 0,0019 |
| Taxa de oócitos viáveis | 16 | 37,47 ± 2,16 | 49,97 ± 2,49 | 0,0002 |
| Número de clivados | 16 | 3,37 ± 0,64 | 5,25 ± 0,81 | 0,0710 |
| Taxa de clivagem (%) | 16 | 63,65 ± 3,25 | 63,07 ± 3,00 | 0,8962 |
| Número de embriões | 16 | 0,37 ± 0,21 | 1,25 ± 0,39 | 0,0522 |
| Taxa de embriões (%) | 16 | 8,88 ± 1,21 | 14,86 ± 1,45 | 0,0016 |
| OPU Geral | | | | |
| Variáveis | N | Tratamentos | | Valor de P |
| | | T1 | T2 | |
| Número de oócitos totais | 64 | 8,71 ± 4,76 | 15,00 ± 4,31 | <0,0001 |

| | | | | |
|---------------------------|----|---------------|---------------|---------|
| Número de oócitos viáveis | 64 | 6,29 ± 3,53 | 10,54 ± 4,07 | <0,0001 |
| Número de clivados | 64 | 4,08 ± 3,96 | 6,63 ± 2,25 | 0,0001 |
| Taxa de clivagem (%) | 64 | 66,81 ± 16,04 | 69,02 ± 10,56 | 0,9292 |
| Número de embriões | 64 | 0,83 ± 1,02 | 1,63 ± 1,47 | 0,0126 |
| Taxa de embriões (%) | 64 | 12,26 ± 10,56 | 15,92 ± 17,40 | 0,7467 |

317 * ± erro padrão da media.

318

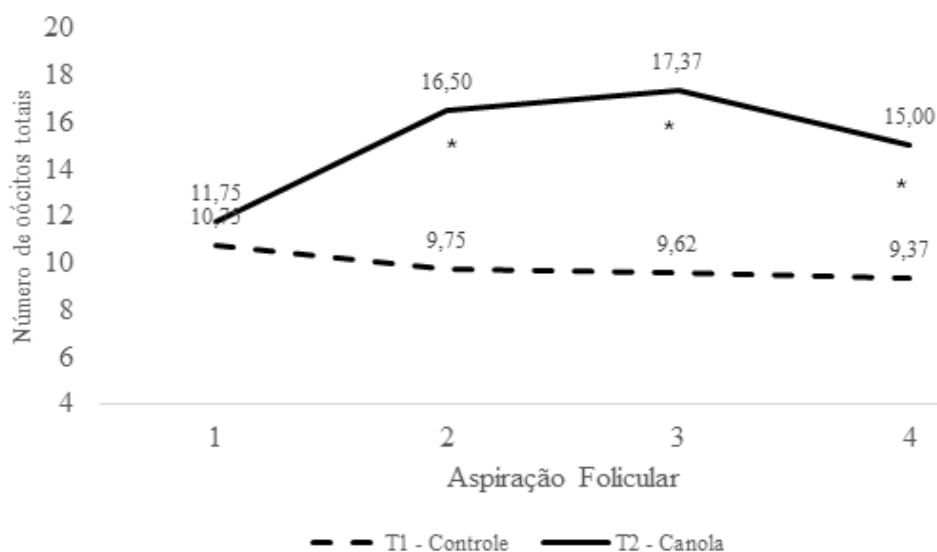
319 No entanto, para quantidade de oócitos totais e inviáveis pode-se observar que o
320 efeito da adição de canola em grão na dieta aparece somente a partir da segunda sessão
321 de aspiração folicular (Figura 2), ou seja, 53 dias de fornecimento da canola em grão.

322

323 Figura 2. Efeito da inclusão de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês no
324 número oócitos totais aspirados

325

326



327

328

329 O aumento no número de oócitos aspirados está diretamente relacionado com o
330 número de folículos presentes no ovário no momento da aspiração folicular, na Tabela
331 4 observa-se que os animais alimentados com canola em grão apresentaram aumento
332 ($p < 0,05$) no número de folículo totais, não existindo efeito ($p > 0,05$) da adição de canola
333 em grão na dieta de novilhas no tamanho do folículo ovulatório e o tamanho do CL.

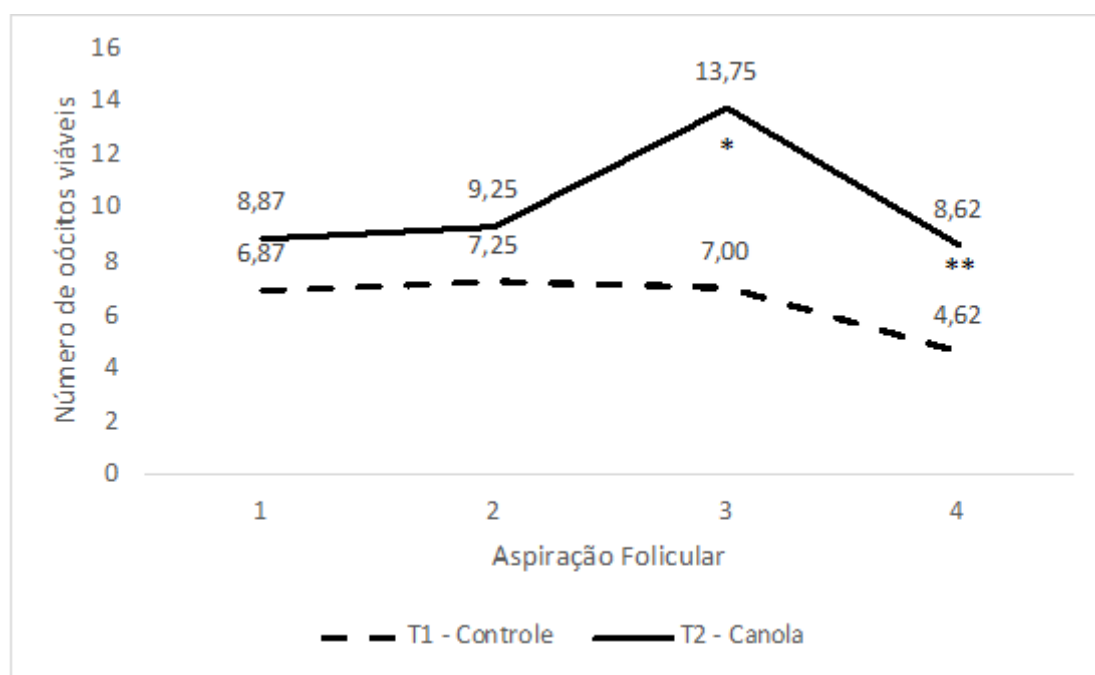
334 Tabela 4. Efeito da inclusão de Canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês no
 335 número de folículos totais, tamanho do folículo dominante e tamanho do corpo lúteo

| Metabólitos | Tratamentos | | Valor de P |
|--------------------------------|--------------|--------------|------------|
| | T1 | T2 | |
| Número de folículos totais | 15,00 ± 3,15 | 28,00 ± 4,08 | 0,0153 |
| Tamanho do folículo ovulatório | 12,53 ± 2,14 | 12,01 ± 1,66 | 0,4852 |
| Tamanho do corpo lúteo | 22,64 ± 3,26 | 24,45 ± 3,29 | 0,1027 |

336 Com relação a quantidade de oócitos viáveis, o efeito ($p < 0,05$) da adição de canola
 337 em grão na dieta aparece após a terceira sessão de aspiração, ou seja, 75 dias de ingestão
 338 de canola em grão (Figura 3).

339

340 Figura 3. Efeito da inclusão de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês no
 341 número de oócitos viáveis aspirados.



342

343

344

345 Observa-se na Tabela 5 que houve aumento nas concentrações sanguíneas de
 346 colesterol total ($p = 0,06$) e creatina ($p = 0,04$) não existindo efeito para os níveis de
 347 Alanina Aminotransferase (ALT), Fosfatase alcalina (FA), ureia e triglicerídeos nos
 348 animais alimentados com canola em grão.

349 Tabela 5. Efeito da inclusão de canola em grão na dieta de novilhas da raça Holandês e
 350 seu efeito nas concentrações sanguíneas de alguns metabólitos sanguíneos

| Metabólitos | Unidade de medida | Tratamentos | | Valor de P |
|------------------|-------------------|---------------|---------------|------------|
| | | T1 | T2 | |
| ALT | U/L | 28,37 ± 2,37 | 26,75 ± 2,37 | 0,63 |
| Creatinina | mg/dL | 1,17 ± 0,04 | 1,32 ± 0,04 | 0,04 |
| FA | U/L | 48,12 ± 4,52 | 39,00 ± 4,52 | 0,17 |
| Ureia | mg/dL | 25,12 ± 1,95 | 26,75 ± 1,95 | 0,56 |
| Colesterol total | mg/dL | 118,75 ± 8,55 | 143,12 ± 8,55 | 0,06 |
| Triglicerídeos | mg/dL | 65,37 ± 3,96 | 64,12 ± 3,96 | 0,82 |

351 T1 = Controle; T2 = Canola; ALT = Alanina aminotransferase; Creatinina; FA = Fosfatase alcalina; Ureia;
 352 Colesterol total; triglicerídeos.

353

354 4. Discussão

355

356 A inclusão de canola em grão, rica em ácidos graxos insaturados, na dieta de
 357 novilhas da raça Holandês proporciona aumento na quantidade de gordura ingerida e, por
 358 sua vez, o fluxo de ácidos graxos totais no intestino delgado. O fato de a canola estar
 359 sendo fornecida em grão poderia conferir, pelo menos em parte, uma proteção natural a
 360 ação de microrganismos ruminais, o que manteria uma proporção superior de ácidos
 361 graxos insaturados disponíveis para serem absorvidos no intestino.

362 Este aumento na quantidade de ácidos graxos disponíveis determinou aumento
 363 ($p < 0,05$) na quantidade de folículos disponíveis para aspiração folicular, e
 364 concomitantemente, maior número de oócitos totais, viáveis e inviáveis. Houve também
 365 aumento ($p < 0,05$) nas concentrações sanguíneas de colesterol total ($p = 0,06$) e creatina
 366 ($p = 0,04$) não existindo efeito para os níveis de ALT, FA, ureia e triglicerídeos nos animais
 367 alimentados com canola em grão. Estes achados corroboram com os resultados
 368 encontrados por Moallem *et al.* (2013); Nogueira *et al.* (2012) e Bilby *et al.* (2006) que
 369 também observaram aumento no número de folículos aspirados e de oócitos produzidos
 370 após a aspiração folicular ao alimentar vacas e novilhas da raça Holandês com diferentes
 371 fontes de gordura na dieta, mas ricas em ácidos graxos poli-insaturados.

372 Um dos efeitos benéficos do aumento de gordura nas variáveis reprodutivas ocorre
 373 pelo aumento na quantidade e no tamanho dos folículos e do corpo lúteo (Vasconcelos *et*
 374 *al.*, 2001; Muller *et al.*, 2009). O número de folículo presente no ovário no momento da

375 aspiração folicular pode ser afetado pelo componente genético e pode estar relacionado
376 com alterações nas concentrações de insulina, colesterol, hormônio do crescimento e
377 concentrações séricas de IGF-I e HDL-colesterol, substâncias que estão diretamente
378 envolvidas na foliculogênese ovariana (Urlep; Rozman, 2013; Tessaro *et al.*, 2015).

379 Recentemente, Moallem *et al.* (2013) e Moallem (2018) afirmaram que os efeitos
380 relacionados com a inclusão de gordura na dieta no número de folículos totais, podem
381 estar relacionados com o aumento na circulação e no líquido folicular de AGs da série 3,
382 entre eles o C18:3n3 (ácido linolênico), sendo observado neste experimento. Desta forma,
383 mais estudos são necessários para elucidar a maneira pelo qual alguns AGs da série 3
384 estariam afetando o crescimento folicular e a qualidade do oócito, podendo, até mesmo,
385 justificar os resultados encontrados neste experimento, em que o fornecimento de canola
386 em grão aumentou a quantidade de oócitos produzidos.

387 Pode-se ainda, enfatizar que somente a partir da segunda sessão de aspiração
388 folicular, ou seja, 53 dias de fornecimento da canola em grão, observa-se o efeito
389 significativo na quantidade de oócitos totais e inviáveis e, 75 dias para os oócitos viáveis,
390 ou seja, é necessário um tempo para o que tecidos ou o próprio ovário esteja sob efeito
391 dos ácidos graxos presente na circulação. Moallem *et al.* (2018) sugeriram que o tempo
392 de fornecimento da dieta, rica em AGPI, é essencial para que ocorra a incorporação nos
393 tecidos-avos, tais como, ovários e testículos.

394 Pode-se observar neste experimento, que houve aumento na taxa de blastocisto a
395 partir da 03 e 04 aspirações foliculares e número de embriões viáveis nos animais
396 alimentados com canola em grão, não existindo efeito na taxa de embriões produzidos.
397 Quanto ao número de embriões, este efeito parece ser consequência do aumento no
398 número de oócitos aspirados nos animais alimentados com canola em grão.

399 Quanto a taxa de blastocisto, um estudo conduzido por Fouladi-Nashta *et al.* (2007)
400 com vacas da raça Holandês em lactação, alimentadas com 200 ou 800 gramas por dia
401 com sais de AGs (Megalac - de óleo de coco). Mostrou, após 7 sessões de OPU, que os
402 animais alimentados com 800 gramas de Megalac/dia apresentaram aumento na taxa de
403 blastocisto (38,0%), quando comparado aos animais do grupo controle (29,1%).

404 Freret *et al.* (2019) observaram, após realizarem 5 sessões de OPU em vacas da raça
405 Holandês suplementada com óleo de peixe e ou óleo de soja microencapsulado pelo
406 período de 9 semanas, que houve aumento significativo na taxa de blastocisto ($49,6 \pm$

407 5,5% vs $42,3 \pm 5,5\%$, respectivamente), e na composição lipídica da estrutura da
408 membrana celular nos animais alimentados com óleo de peixe, sendo assim, os autores
409 concluíram que a inclusão de óleo de peixe melhorou a qualidade dos oócitos e a produção
410 de embriões *in vitro*.

411 Portanto, os efeitos benéficos da inclusão de AGPI na dieta de animais ruminantes
412 na produção de embriões *in vitro*, parece depender da quantidade e do tipo de ácido graxo
413 na circulação e disponível para ser utilizado no ovário (Zeng *et al.*, 2023), que é o reflexo
414 da fonte de gordura utilizada na dieta, da quantidade, do tempo de fornecimento, do perfil
415 de AG e do método de proteção do mesmo (Moallem *et al.* 2018). Moallem *et al.* (2018)
416 ainda relataram que a suplementação de gordura na dieta, rica em AG n-3, pode melhorar
417 a competência dos oócitos, incorporando algum tipo de AG na membrana plasmática ou
418 no citoplasma do oócito beneficiando a produção de embriões.

419 No entanto, outros autores (Ponter *et al.*, 2012; Domingues *et al.*, 2014 e Verdurico,
420 2015) não encontraram efeito da inclusão de gordura na taxa de embriões produzidos *in*
421 *vitro*, desta forma, parece que os efeitos da inclusão de gordura na dieta, na produção de
422 embriões, apresentam-se de maneira contraditória.

423

424 **5. Conclusão**

425 Conclui-se que o fornecimento de canola em grão na dieta de novilhas da raça
426 Holandês aumentou o número de oócito totais, viáveis e inviáveis e o número de clivados
427 e de embriões, a partir da terceira sessão de aspiração folicular, contudo, não houve efeito
428 sobre a taxa de clivagem e a taxa de embriões. Assim, os animais alimentados com canola
429 em grão apresentaram aumento no número de folículos totais disponível para aspiração,
430 sem alterar o tamanho do folículo dominante e do corpo lúteo.

431

432 **Referências**

433

434 Alves, J.P.M., Fernandes-Calderon, C.E.M., Rosseto, R., Bertolini, M., Rondina, D.
435 2021. Short-term supplementation of diets rich in lipids or glycogen precursors can
436 affect intra-follicular environment, oocyte mitochondrial gene expression, and embryo

- 437 development following parthenogenesis in goat. *Small Ruminant Research*. 194, 106-
438 279. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106279>.
- 439 Ambrose, D.J., Kastelic, J.P., Corbett, R., Pitney, P.A., Petit, H.V., Small, J.A.,
440 Zalkovic, P. 2006. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in
441 alpha-linolenic acid. *Journal of Dairy Science*. 89 (8), 3066-3074.
442 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72581-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72581-4).
- 443 Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis*, 15.ed.
444 Virginia, 1990. p. 1298.
- 445 Bilby, T.R., Block, J., Do Amaral, B.C., Sa Filho, O., Silvestre, F.T., Hansen, P.J.,
446 Thatcher, W.W. 2006. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and
447 follicular development in lactating dairy cows in summer. *Journal of Dairy Science*. 89
448 (10), 3891-3903. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72432-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72432-8).
- 449 Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification.
450 *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37 (8), 911-917.
- 451 Childs, S., Hennessy, A.A., Sreenan, J.M., Wathes, D.C., Cheng, Z., Stanton, C.,
452 Kenny, D.A. 2008. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid
453 supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected
454 reproductive variables in cattle. *Theriogenology*. 70 (4), 595-611.
455 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.002>.
- 456 De Loos, F., Van Vliet, C., Van Maurik, P., Kurip, T.A. 1989. Morphology of immature
457 bovine oocytes. *Gamete Research*, 24, 197-204.
- 458 Domingues, M.C.N., Rigolon, L.P., Cavalieri, F.L.B., Seko, M.B., Albuquerque, K.,
459 Zancheta, C.G. 2014. Viabilidade de embriões vitrificados oriundos da fertilização in
460 vitro de oócitos de vacas suplementadas com canola. *Arquivo Brasileiro de Medicina*
461 *Veterinária e Zootecnia*. 66, 145-151. [https://doi.org/10.1590/S0102-](https://doi.org/10.1590/S0102-09352014000100021)
462 [09352014000100021](https://doi.org/10.1590/S0102-09352014000100021).
- 463 Elis, S., Freret, S., Desmarchais, A., Maillard, V., Cognié, J., Briant, E., Touzé, J.L.,
464 Dupont, M., Faverdin, P., Chajes, V., Uzbeko, V.A.S., Monget, P., Dupont, J. 2016.
465 Effect of a long chain n-3 PUFA-enriched diet on production and reproduction variables
466 in Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 164, 121-132.
467 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.020>.
- 468 Fouladi-Nashta, A.A., Gutierrez, C.G., Gong, J.G., Garnsworthy, P.C., Webb, R. 2007.
469 Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows.

470 Biology Reproduction. 77, 9-17. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.058578>.

471 Fontes, P.L., Henry, D.D., Ciriaco, F.M., Oosthuizen, N., Cooke, R.F., Mercadante,
472 V.R., Lamb, G.C. 2019. Effects of polyunsaturated fatty acids supplementation on
473 reproductive parameters associated with the performance of suckled beef cows. *Animal*.
474 13 (2), 349-357. <https://doi.org/10.1017/S175173111800143X>.

475 Freret, S., Oseikria, M., Le Bourhis, D., Desmarchais, A., Briant, E., Desnoes, O., Elis,
476 S. 2019. Effects of a n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet on embryo production
477 in dairy cows. *Reproduction*. 158, 71-83. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0644>.

478 International Embryo Transfer Society. 2013. In *Manual of the International Embryo*
479 *Transfer Society: Society*. Savoy, IL, USA. 103-116.

480 International Organization for Standardization. 1978. EN ISO 5509: Animal and
481 vegetable fats and oils: preparation of methyl esters of fatty acids. London: ISSO.

482 Moallem, U. 2018. Invited review: Roles of dietary n-3 fatty acids in performance, milk
483 fat composition, and reproductive and immune systems in dairy cattle. *Journal of Dairy*
484 *Science*. 101 (10), 8641-8661. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14772>.

485 Moallem, U., Shafran, A., Zachut, M., Dekel, I., Portnick, Y., Arieli, A. 2013. Dietary
486 a-linolenic acid from flaxseed oil improved folliculogenesis and IVF performance in
487 dairy cows, similar to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil.
488 *Reproduction*. 146 (6), 603-614.

489 Muller, M., Prado, I.N., Lobo- Júnior, A.R., Silva, R.R., Capovilla, L.C.T., Rigolon,
490 L.P., Marques, J.A. 2009. w-3 E w-9 sobre o desempenho, resposta superovulatória e
491 produção de embriões em nelore. *Archivos de Zootecnia*. 58 (222), 241-252.

492 Nogueira, É., Silva, A.S.D., Amaral, T.B., Ítavo, L.C.V., Dias, A.M., Mingoti, G.Z.
493 2012. Follicular dynamics and production of oocytes in young Nelore heifers with
494 energetic supplementation. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41 (9), 2012-2017.
495 <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000900007>.

496 National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7^{ed}.
497 Washington: National Academy Press, p.381.

498 Oliveira, R.T.D. 2017. Grãos de oleaginosas inteiros na alimentação de bovinos em
499 confinamento. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal da Grande
500 Dourados (UFGD). Dourados. <http://repositorio.ufgd.edu.br/jspui/handle/prefix/3205>.

- 501 Petit, H.V. 2002. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition
502 of dairy cows fed whole flaxseed. *Journal Dairy Science*. 85 (6), 1482-1490.
503 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74217-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74217-3).
- 504 Ponter, A.A., Guyader-Joly, C., Nuttinck, F., Grimard, B., Humblot, P. 2012. Oocyte
505 and embryo production and quality after OPU-IVF in dairy heifers given diets varying
506 in their n-6/n-3 fatty acid ratio. *Theriogenology*. 78 (3), 632-645.
507 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.009>.
- 508 Robinson, R.S., Pushpakumara, P.G.A., Cheng, Z., Peters, A.R., Abayasekara, D.R.E.,
509 Wathes, D.C. 2002. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and
510 uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction*. 124, 119-131.
- 511 Statistical Analyses System. SAS® OnDemand for Academics, 2024 (on-line).
- 512 Scaliante-Júnior, J.R. 2021. Perfil plasmático de ácidos graxos e taxa de concepção em
513 vaca Nelore suplementadas com semente de girassol. Tese de Doutorado – Unesp,
514 Araçatuba. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/202786>.
- 515 Sinedino, L.D., Honda, P.M., Souza, L.R., Lock, A.L., Boland, M.P., Staples, C.R.,
516 Santos, J.E. 2017. Effects of supplementation with docosahexaenoic acid on
517 Reproduction of Dairy Cows. *Reproduction*. 153 (5), 707-723.
- 518 Staples, C.R., Burke, J.M., Thatcher, W.W. 1998. Influence of Supplemental Fats on
519 Reproductive Tissues and Performance of Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*. 81
520 (3), 856–871.
- 521 Tessaro, F.H., Ayala, T.S., Martins, J.O. 2015. Lipid mediators are critical in resolving
522 Inflammation: a review of the emerging roles of eicosanoids in diabetes mellitus.
523 *BioMed Research International*. 2015, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/568408>.
- 524 Urlep, Z., Rozman, D. 2013. The interplay between circadian system, cholesterol
525 synthesis, and steroidogenesis affects various aspects of female reproduction. *Frontiers*
526 *in Endocrinology*. 4, 111. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00111>.
- 527 Van Soest, P.V., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber,
528 neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition.
529 *Journal of Dairy Science*, 74 (10), 3583-3597.
- 530 Vasconcelos, L., Sartori, R., Oliveira, H.N., Guenther, J.G., Wiltbank, M.C. 2001.
531 Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy
532 rates. *Theriogenology*. 56 (2), 307-314. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00565-](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00565-9)
533 9.

- 534 Verdurico, L.C. 2015. Efeito da suplementação prolongada de ácidos graxos insaturados
535 na alimentação de novilhas *Bos taurus* sobre a qualidade oocitária e embrionária e perfil
536 metabólico. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo (USP). Faculdade de
537 Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/SBD) Pirassununga.
538 <https://doi.org/10.11606/T.10.2015.tde-14092015-095229>.
- 539 Wildman, O.E.E., Jones, G.M., Wagner, P.E. 1982. A dairy cow body condition scoring
540 system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy*
541 *Science*. 65 (3), 495-501. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82223.-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82223.-6)
- 542 Zeng, X., Li, S., Liu, L., Cai, S., Ye, Q., Xue, B., Zeng, X. 2023. Role of functional
543 fatty acids in modulation of reproductive potential in livestock. *Journal of Animal*
544 *Science and Biotechnology*,14 (24), 2- 19. <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00818-9>.