UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária

Dissertação

Efeito do butafosfan e cianocobalamina sobre a produção de oócitos e embriões *in vitro* de vacas Jersey

Márcio Erpen Lima

Pelotas, 20 de fevereiro de 2014

MÁRCIO ERPEN LIMA

Efeito do butafosfan e cianocobalamina sobre a produção de oócitos e embriões *in vitro* de vacas Jersey

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Clínicas Veterinária).

Orientador: Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa
Co-Orientadores: Cássio Cassal Brauner
Francisco Augusto Burklet Del Pino
Viviane Rohrig Rabassa

Pelotas, 20 de fevereiro de 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L732e Lima, Márcio Erpen

Efeito do butafosfan e cianocobalamina sobre a produção de oócitos e embriões in vitro de vacas jersey / Márcio Erpen Lima, Rubens Alves Pereira ; Marcio Nunes Corrêa, orientador. — Pelotas, 2014.

42 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Fósforo. 2. Vitamina b12. 3. Vaca leiteira. 4. Blastocisto. 5. Vaca doadora. I. Pereira, Rubens Alves. II. Corrêa, Marcio Nunes, orient. III. Título.

CDD : 636.224

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa (Orientador)

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin

Dr. Manoel Francisco de Sá Filho

Dr. Rubens Alves Pereira

Prof. Dr. Rafael Gianella Mondadori (Suplente)

Agradecimentos

A Deus, em primeiro lugar.

A minha família, principalmente meus pais João José e Kátia Lima pelos ensinamentos, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida. Ao meu irmão Leonardo Lima pela amizade e respeito.

A minha namorada Rafaela Amaral pela compreensão, companheirismo e carinho.

A equipe Nupeec por todos os desafios e aprendizados proporcionados ao longo desses 6 anos de trabalho.

Aos meus colegas da pós-graduação e graduação pelo auxílio, aprendizado e amizade.

Aos colegas da In Vitro Sul Carlos Eduardo Martin e Sofia Leal pela participação e companheirismo ao longo do desenvolvimento do experimento.

A Cabanha da Maya e seus funcionários pela oportunidade e colaboração na execução do trabalho.

A Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de estudo.

Ao meu orientador prof. Marcio Nunes Corrêa pelo incentivo, confiança, amizade e exemplo de vida.

Resumo

LIMA, Márcio Erpen. **Efeito do butafosfan e cianocobalamina sobre a produção de oócitos e embriões *in vitro* de vacas Jersey.** 2014. 43f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de butafosfan e cianocobalamina (BTC) em vacas da raça Jersey sobre a recuperação de oócitos *in vivo* e produção de embriões *in vitro*. Trinta e seis vacas foram separadas igualmente em dois experimentos idênticos, realizados em épocas diferentes. Em cada experimento, o grupo BTC (n=9) recebeu nove aplicações de 4500 mg de butafosfan e 2,25 mg de cianocobalamina e o grupo Controle (n = 9) recebeu placebo. O tratamento foi realizado nos dias 0, 5, 9, 14, 19, 23, 28, 33, 37 e 42 concomitantemente às coletas de sangue para análises das concentrações de fósforo, colesterol, ureia e ácidos graxos não esterificados (AGNES). Durante o mesmo período, cada vaca foi submetida à 4 sessões (dias 0, 14, 28 e 42) de aspiração folicular (AF) e produção *in vitro* de embriões. No exp. 1, as vacas tratadas com BTC tiveram uma tendência ($P = 0.08$) de redução do colesterol sérico e uma maior ($P = 0.02$) média de embriões produzidos na AF d 28. No exp. 2, o grupo BTC apresentou uma tendência ($P = 0.09$) de redução das concentrações de AGNES e de aumento ($P = 0.07$) na produção de oócitos grau II. Além disso, na AF d 42 observou-se uma redução ($P = 0.01$) dos níveis de AGNES e um aumento ($P \leq 0.05$) do número de folículos puncionados, oócitos recuperados e oócitos viáveis nos animais do grupo BTC. Estes resultados indicam que a suplementação com butafosfan e cianocobalamina em vacas leiteiras melhora o status energético e aumenta a produção de oócitos e embriões *in vitro*.

Palavras-chave: fósforo. vitamina B12. Vaca leiteira. Blastocisto. Vaca doadora

Abstract

LIMA, Márcio Erpen. **Efeito do butafosfan e cianocobalamina sobre a produção de oócitos e embriões in vitro de vacas Jersey.** 2014. 43f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The aim of this study was to evaluate the effects of supplementation of butafosfan and cyanocobalamin (BTC) in Jersey cows on the *in vivo* oocytes recovery and *in vitro* embryos production. Thirty-six cows were homogeneously divided into two identical experiments, performed at different periods. In each experiment, the BTC group (n=9) that received 4500 mg of butafosfan and 2.25 mg of cyanocobalamin and the control group (n=9) that received placebo (NaCl 0.9%). The treatment was performed on days 0, 5, 9, 14, 19, 23, 28, 33, 37 and 42, concurrently with blood samples collection for analysis of phosphorus, cholesterol, urea and non-esterified fatty acids (NEFA). During the same period, each cow was subjected to 4 sessions (days 0, 14, 28 and 42) of ovum pick up (OPU) and *in vitro* embryo production. In exp. 1, the BTC group had a tendency (P=0.08) to lower cholesterol blood concentration and a higher number of embryos produced at IVF 28 (P=0.02). In exp. 2, BTC group tended (P=0.09) to reduce concentrations of NEFA and to increase (P=0.07) the production of grade II oocytes. Moreover, at the IVF42 was observed reduction (P=0.01) of the blood NEFA concentrations and increases (P≤0.05) of the number of punctured follicles, oocytes retrieved and mature oocytes in the BTC group. These results indicate that supplementation with butafosfan and cyanocobalamin in dairy cows improves the energy status and increases *in vitro* production of oocytes and embryos.

Keywords: Phosphorus. Vitamin B12. Dairy cow. Blastocyst. Donor cow

.

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema ilustrando a hipótese do estudo através das interações metabólicas provocadas pela suplementação com BTC. 37
Figura 2. Protocolo experimental demonstrando o período de tratamento com butafosfan e cianocobalamina (grupo BTC, n = 9) e aspirações foliculares. O grupo controle (n = 9) que recebeu aplicação im de placebo (NaCl 0,9%). AF = Aspiração folicular; BTC = administração de 4500 mg de butafosfan e 2,25 mg cianocobalamina. 37
Figura 3. Concentrações séricas de colesterol de vacas tratadas com 4500 mg de butafosfan e 2,25 mg de cianocobalamina (grupo BTC, n = 9) ou controle (NaCl 0,9%, n = 9) durante 42 dias do experimento 1. 38
Figura 4. Distribuição dos oócitos pelo grau de qualidade de acordo com tratamento com 4500 mg de butafosfan e 2,25 mg de cianocobalamina (grupo BTC, n = 9) ou controle (NaCl 0,9%, n = 9) durante o período de 42 dias de cada experimento. 38
Figura 5. Concentrações séricas de AGNES de vacas tratadas com 4500 mg de butafosfan e 2,25 mg de cianocobalamina (Grupo BTC, n = 9)ou placebo (NaCl 0.9%, n = 9) durante o período de 42 dias do *exp. 1* (A) ou *exp. 2* (B). . 39

Lista de Tabelas

Tabela 1. Médias (± EPM) dos parâmetros reprodutivos de 4 sessões de aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões de vacas Jersey tratados com 4500 mg de butafosfan e 2,25 mg de cianocobalamina (grupo BTC, n = 9) ou placebo (NaCl 0,9%, n = 9) durante o período de 42 dias. 35
Tabela 2. Médias (± EPM) de fósforo, ureia, colesterol e AGNES de vacas Jersey tratados com 4500 mg de butafosfan e 2,25 mg de cianocobalamina (grupo BTC, n = 9) ou placebo (NaCl 0,9%, n = 9) durante o período de 42 dias submetidas a 4 sessões de AF e PIV. 36

Lista de Abreviaturas

AF – Aspiração Folicular

AGNES – Ácidos Graxos Não Esterificados

ATP – Adenosina Trifosfato

BTC – Butafosfan e Cianocobalamina

BEN – Balanço Energético Negativo

BHB – Betahidroxibutirato

BSA – Albumina Sérica Bovina

CCOs - Complexos Cúmulos Oócitos

ECC – Escore de Condição Corporal

FIV – Fertilização *In Vitro*

IETS – Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões

IMS – Ingestão de Matéria Seca

MAPK – Proteina quinase ativadora de mitógenos

OPU – “Ovum Pick Up”

PHE – Penicilina Hipotaurina Epinefrina

PIV – Produção *In Vitro*

SOF – Fluido Sintético de Oviduto

Sumário

1 INTRODUÇÃO 11
2 OBJETIVOS 14
3 ARTIGO 15
4 CONCLUSÃO GERAL 40
6 REFERÊNCIAS 41

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é responsável por mais de 60% da produção mundial de embriões *in vitro*, ocupando uma posição de destaque no cenário global (Stroud, 2011). As principais vantagens da produção *in vitro* (PIV) em comparação a múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOTE) *in vivo* envolvem a dispensa de tratamentos hormonais, menor intervalo entre coletas e a possibilidade de geração de um maior número de produtos/vaca/ano (Martins, 2010). A eficiência da PIV está estritamente ligada à obtenção dos oócitos, sua viabilidade e qualidade, bem como ao sucesso dos processos de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*.

A PIV no Brasil se destacou nos últimos anos pela grande disseminação do uso da biotécnica em doadoras de raças zebuínas. Tal uso pode ser justificado pela característica de vacas *Bos indicus* que têm uma maior população de folículos ovarianos propiciando um maior número de oócitos recuperados por aspiração folicular (AF) que vacas *Bos taurus* (Pontes et al., 2009). Esse maior número de oócitos recuperados reflete numa maior produção de embriões e prenhez por doadora submetida à AF e PIV com menor custo operacional. Entretanto, nas últimas décadas os sistemas leiteiros, devido ao seu crescimento e expansão, têm agregado valor ao material genético e demonstrado uma grande procura pela PIV como ferramenta para multiplicação dos animais superiores em larga escala. Porém, não tem se observado altas respostas reprodutivas em de vacas leiteiras submetidas à AF e PIV, dificultando assim a disseminação do uso da biotécnica. Isso ocorre devido às características genéticas dos animais *Bos taurus*, atrelado a baixa performance reprodutiva provocada pela intensa produção leiteira (Butler et al., 2003). Além disso, a difusão do uso da PIV em sistemas leiteiros é dependente do uso de sêmen sexado que, assim como na inseminação artificial, apresenta menores taxas de clivagem e produção de blastocistos em comparação ao sêmen convencional na PIV (Wilson et al., 2006). Por fim, de uma forma geral, resultados entre 15-30% de produção de blastocistos a partir de oócitos com

uso de sêmen sexados são considerados satisfatórios por vários autores (Xu et al., 2002; Pontes et al., 2010).

A partir desse contexto, alternativas tem sido propostas para aumentar os resultados de produção *in vitro* de embriões de vacas taurinas. O uso de substâncias que influenciam fatores metabólicos é uma alternativa potencial para melhorar o desempenho de vacas leiteiras na PIV. O butafosfan é uma fonte orgânica de fósforo, em sua molécula possui 17,3% de P, sua indicação convencional consiste no tratamento de desordens metabólicas, bem como suporte no tratamento de infertilidade, tetania e paresia, e como um adjuvante na terapia de cálcio e magnésio (EMEA, 2000). No organismo o fósforo tem importante ação no sistema de tamponamento de hidrogênio no sangue, componente crítico dos ácidos nucléicos, da adenosina trifosfato (ATP) e adenosina monofosfato (AMP) (Cunningham, 2002). Além disso, o fósforo desempenha um importante papel no metabolismo hepático de carboidratos, pois todos os compostos intermediários da via gliconeogênica devem ser fosforilados. Assim, as taxas de gliconeogênese e glicogenólise podem ser reguladas pelas concentrações de fósforo (Berg et al., 2006). A cianocobalamina é uma forma sintética da Vitamina B12 que atua como co-fator da enzima methilmalonil-Coa mutase, responsável pela conversão do methilmalonilCoa em succinil-Coa, de tal modo que sua ação está relacionada à velocidade do ciclo de Krebs e da gliconeogênese (Taoka et al., 1994). Portanto, uma deficiência de vit. B12 pode reduzir a produção de oxalacetato, diminuindo a atividade do ciclo de Krebs e reduzindo a taxa gliconeogênica.

A partir desses mecanismos de ação, atualmente o butafosfan e a cianocobalamina têm sido recomendados durante o pós parto recente de vacas leiteiras, com efeitos comprovados sobre a redução das concentrações de AGNES (Pereira et al., 2013a) e betahidroxibutirato (BHB), além da diminuição da severidade do balanço energético negativo (BEN) (Rollin, 2010), bem como do aumento da produção leiteira (Kreipe et al., 2011). Já em ovelhas recém paridas, o resultado foi o aumento da IMS (Pereira et al., 2013b). Com relação a produção *in vitro* de embriões, apenas o estudo de Reis et al. (2012) com vacas Girolando encontrou efeitos benéficos da suplementação com butafosfan e cianocobalamina sobre os parâmetros reprodutivos avaliados.

Até o momento, na literatura revisada, não foi possível encontrar nenhum trabalho que avaliou os efeitos da suplementação de butafosfan e/ou cianocobalamina em vacas taurinas sobre a PIV de embriões bovinos. Deste modo, trabalhamos com a hipótese que a suplementação de butafosfan e cianocobalamina para vacas leiteiras aumenta o número e qualidade de oócitos, propiciando uma maior produção *in vitro* de embriões por doadora através da redução das concentrações de AGNES (Figura 1).

2 OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com butafosfan e ciancobalamina para vacas lactantes e não lactantes da raça Jersey sobre o número e qualidade de oócitos recuperados e a produção *in vitro* de embriões. Ainda foram avaliados alguns objetivos específicos, como:

- Efeito do butafosfan e cianocobalamina sobre os marcadores bioquímicos fósforo, colesterol total, ureia e ácidos graxos não esterificados;
- Relação da resposta entre os marcadores bioquímicos e os parâmetros reprodutivos;
- Avaliação de um protocolo de suplementação com butafosfan e cianocobalamina para incrementar a produção de embriões *in vitro* de vacas leiteiras de raças taurinas de alto potencial genético para produção de leite.

3 ARTIGO

Efeito do butafosfan e cianocobalamina sobre a obtenção de oócitos e produção de embriões *in vitro* de vacas Jersey

Márcio E. Lima[a], Rubens A. Pereira[a], Carlos E.G. Martin[b], Sofia C.B.Leal[b], Gustavo M. Fischer[a], Josiane Feijó[a], Cássio C. Brauner[a], Francisco A. B. Del Pino[a], Marcio N. Corrêa[a]

[a]*Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), UFPel, Pelotas, RS, 96010900, Brazil*

[b] *In Vitro Sul, Pelotas, RS, Brazil*

Irá ser submetido à Revista Theriogenology

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the effects of supplementation of butafosfan and cyanocobalamin (BTC) in lacting (n = 24) e dry (n = 12) Jersey cows on the *in vivo* oocytes recovery and *in vitro* embryos production. Thirty-six cows were homogeneously divided into two identical experiments, performed at different periods. In each experiment, the BTC group (n=9) that received 4500 mg of butafosfan and 2.25 mg of cyanocobalamin and the control group (n=9) that received placebo (NaCl 0.9%). The treatment was performed on days 0, 5, 9, 14, 19, 23, 28, 33, 37 and 42, concurrently with blood samples collection for analysis of phosphorus, cholesterol, urea and non-esterified fatty acids (NEFA). During the same period, each cow was subjected to 4 sessions (days 0, 14, 28 and 42) of ovum pick up (OPU) and *in vitro* embryo production. In exp. 1, the BTC group had a tendency (P=0.08) to lower cholesterol blood concentration and a higher number of embryos produced at IVF28 (P=0.02). In exp. 2, BTC group tended (P=0.09) to reduce concentrations of NEFA and to increase (P=0.07) the production of grade II oocytes. Moreover, at the IVF42 was observed reduction (P=0.01) of the blood NEFA concentrations and increases (P≤0.05) of the number of punctured follicles, oocytes retrieved and mature oocytes in the BTC group. These results indicate that supplementation with butafosfanand cyanocobalamin in dairy cows improves the energy status and has an effect on the *in vitro* production of oocytes and embryos.
Keywords: Phosphorus. Vitamin B12. Dairy cow. Blastocyst. Donor cow

3.1 Introdução

O Brasil é responsável por mais de 60% da produção mundial de embriões *in vitro*, ocupando uma posição de destaque no cenário mundial (Stroud, 2011). As principais vantagens da produção *in vitro* (PIV) em comparação a múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOTE) *in vivo* envolvem a dispensa de tratamentos hormonais, menor intervalo entre coletas e a possibilidade de geração de um maior número de produtos/vaca/ano (Martins, 2010). A eficiência da PIV está estritamente ligada à obtenção dos

oócitos, sua viabilidade e qualidade, bem como ao sucesso dos processos de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*.

No âmbito das fêmeas doadoras de gametas, o número, a qualidade e a viabilidade dos oócitos podem ser influenciados por fatores como o grupamento racial, sanidade, ciclicidade e o status metabólico (Thibier et al., 2005). Em termos de metabolismo animal, sabemos que a nutrição, através de substratos e estímulos hormonais, afeta profundamente a atividade reprodutiva de bovinos (Butler et al., 2003). Essas variações no desempenho reprodutivo do rebanho podem ser observadas no tecido ovariano, pois altera o desenvolvimento folicular, a proliferação de células da granulosa e o potencial esteroidogênico (Adamiak et al., 2005). Além disso, a maioria das alterações ocorridas em metabólitos sanguíneos afeta a composição do fluido folicular e a qualidade dos oócitos (Ali et al., 2008). Um trabalho de Vanholderet al. (2006) demonstrou que altas concentrações de ácido graxos não esterificados (AGNES) têm efeito tóxico para bovinos, afetando a função e o desenvolvimento das células da granulosa e o processo de maturação dos oócitos. Da mesma forma, interligando esses fatores, Snijders et al. (2000) relatou que oócitos recuperados de vacas de alto mérito genético para produção de leite obtiveram uma menor taxa de clivagem e desenvolvimento de blastocistos que vacas de médio mérito genético.

O butafosfan é uma fonte orgânica de fósforo, em sua molécula possui 17,3% de fósforo, sua indicação convencional consiste no tratamento de desordens metabólicas, bem como suporte no tratamento de infertilidade, tetania e paresia, e como um adjuvante na terapia de cálcio e magnésio (EMEA, 2000). No organismo o fósforo tem importante ação no sistema de tamponamento de hidrogênio no sangue, componente crítico dos ácidos nucléicos, da adenosina trifosfato (ATP) e adenosina monofosfato (AMP) (Cunningham, 2002). Além disso, o fósforo desempenha um importante papel no metabolismo hepático de carboidratos, pois todos os compostos intermediários da via gliconeogênica devem ser fosforilados. Assim, as taxas de gliconeogênese e glicogenólise podem ser reguladas pelas concentrações de fósforo (Berg et al., 2006). A cianocobalamina é uma forma sintética da Vitamina B12 que atua como co-fator da enzima methilmalonil-Coa mutase,

responsável pela conversão do methilmalonilCoa em succinil-Coa, de tal modo que sua ação está relacionada à velocidade do ciclo de Krebs e da gliconeogênese (Taoka et al., 1994). Portanto, uma deficiência de vit. B12 pode reduzir a produção de oxalacetato, diminuindo a atividade do ciclo de Krebs e reduzindo a taxa gliconeogênica. Em cabras foi demonstrado que a deficiência de vit. B12 tornou o ciclo estral irregular e reduziu as concentrações de progesterona durante o diestro (Mgongo et al., 1984), já em ratos a deficiência durante a fase de crescimento foi relacionada com menor peso do útero e ovário no indivíduo adulto (Dryden & Hartman, 1966).

A partir desses mecanismos de ação, o butafosfan e a cianocobalamina têm sido recomendados durante o pós parto de vacas leiteiras, com efeitos comprovados sobre a diminuição da severidade do balanço energético negativo (BEN) (Rollin, 2010) e aumento da produção leiteira (Kreipe et al., 2011), como consequência da redução das concentrações de AGNES (Pereira et al., 2013a) e B-hidroxibutirato (BHB). Já em ovelhas recém paridas, o resultado foi a redução das concentrações de acetonas e no aumento da IMS (Pereira et al., 2013b). Com relação a parâmetros reprodutivos, apenas o estudo de Reis et al. (2012) com vacas girolando lactantes encontrou benefícios da suplementação com butafosfan e cianocobalamina sobre a produção *in vitro* de embriões de vacas.

Até o momento, na literatura revisada, não foi encontrado nenhum trabalho que avaliou os efeitos da suplementação de butafosfan e/ou cianocobalamina em vacas taurinas sobre a PIV de embriões bovinos. Deste modo, nosso trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da suplementação seriada de butafosfan e cianocobalamina em vacas da raça Jersey sobre a produção de oócitos *in vivo* e embriões *in vitro.* Trabalhou-se com a hipótese que a suplementação de butafosfan e cianocobalamina para vacas leiteiras reduz os níveis de AGNES e aumenta o número e a qualidade dos oócitos, propiciando uma maior produção *in vitro* de embriões por doadora/sessão de OPU.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Bem estar animal

Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas.

3.2.2 Animais e tratamentos

Esse trabalho foi realizado em uma fazenda comercial de gado leiteiro localizada no município de Bagé/RS (31°40’34”S e 54°11’76”W), durante o período de junho a outubro de 2013. Foram utilizadas 36 vacas da raça Jersey adultas com peso médio 437 ± 49,8 kg e escore de condição corporal (ECC, onde 1 = extremamente magro e 5 = extremamente obeso, conforme Wildman et al. (1982)) médio de 3,3 ± 0,7. Das 36 vacas utilizadas no estudo, 12 eram lactantes e 24 não lactantes. Durante o período experimental todas as vacas foram mantidas em sistema de pastejo de azevém (*Lolium multiflorum*) e trevo branco (*Trifolium repens*) ofertado *ad libitum*. As vacas lactantes recebiam após a ordenha uma suplementação com concentrado, silagem de milho e uma mistura mineral divididos em dois fornecimentos diários. As vacas lactantes possuíam uma média de 208 ± 47 dias após o parto e 13,2 ± 1,9 kg de produção de leite diária sendo ordenhadas 2 vezes ao dia. Para execução dos tratamentos os animais foram divididos em dois experimentos, com delineamentos idênticos, variando somente quanto ao período de execução, onde o exp. 1 ocorreu de junho a julho de 2013 (n = 18; 15 lactantes e 3 secas) e o exp. 2 de setembro a outubro de 2013 (n = 18; 9 lactantes e 9 secas). O período de avaliações de cada experimento foi de 42 dias, sendo realizadas 4 sessões de aspirações (AF) foliculares em intervalos de 14 dias (dias 0, 14, 28 e 42). A aplicação do tratamento foi realizada de acordo com cada sessão de aspiração folicular (AF), sendo aplicado o produto nos dias 0, 5 e 9 em relação a AF, e assim sucessivamente de acordo com as demais AF (Figura 2). As vacas foram divididas homogeneamente conforme a categoria produtiva (lactante ou seca) em grupo BTC (n = 9) que recebeu 9 aplicações de 4500 mg de butafosfan e 2,25 mg de cianocobalamina (im, Catosal® B_{12},

Bayer Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e grupo Controle (n = 9) que recebeu 9 aplicações em mesmo volume e via de uma solução placebo (NaCl 0,9%). A primeira AF (dia 0) foi considerada como momento de início do tratamento, assim as vacas do grupo BTC receberam 3 aplicações de BTC antes de cada AF, totalizando 9 aplicações até o final do período experimental (Fig. 2). No momento da AF foi registrado o ECC de cada animal.

3.2.3 Aspiração folicular

Nos exp. 1 e exp. 2 foram realizadas 4 rotinas de AF em intervalos de 14 dias. A coleta dos complexos cúmulos oócitos (CCOs) foi realizada através de AF guiada por sonda transvaginal. Brevemente, todos os folículos visíveis com diâmetro ≥2 mm foram aspirados com uso de equipamento de ultrassom (ScanerB-mode, Aloka SSD 500, Tokyo, Japan) ligado a transdutor de 7.5 MHz micro convexo fixo a uma guia transvaginal. No momento de cada AF foram registrados o diâmetro e distribuição das estruturas ovarianas presentes, classificando-se quanto à presença de corpo lúteo e número de folículos até 3mm, de 3-6mm, 7-10mm, 10-13mm e maiores que 13mm de cada animal. Também foram registrados casos de ovários císticos ou policísticos, sendo esse animal eliminado da coleta pertencente à avaliação experimental. A AF foi realizada sempre pelo mesmo técnico, enquanto outro técnico foi responsável pela classificação dos CCOs e produção *in vitro* dos embriões. Para realização da AF os animais receberam uma injeção epidural de 5mL de cloridrato de lidocaína a 2% (Xylestesin®, Cristália Ltda., Itapira, SP, Brasil), sendo realizada AF através de uma agulha descartável 20 G inserida na guia de punção que possuía uma linha de punção ligada um tubo cônico de 50mL conectado a uma bomba de vácuo. A pressão negativa exercida pela bomba de vácuo era de aproximadamente 80 mmHg com capacidade de fluxo de 13-15mL de solução por minuto. Os CCOs foram selecionados sob estereomicroscópio em placas de petri de acordo com os critérios estabelecidos por De Loss et al. (1989) e posteriormente foram mantidos em gotas com PBS e heparina para serem classificados. Os CCOs foram identificados e classificados em 4 categorias morfológicas baseadas no aspecto e número células do cúmulus: *grau I*, células do cúmulus múltiplas e compactas, ooplasma homogêneo; *grau II*, duas

a três camadas de células cúmulus, ooplasma com granulações mais espessas e escuras; *grau III*, uma camada de células do cúmulus e podendo apresentar manchas enegrecidas; *grau IV*, cúmulus expandido, oócitos desnudos ou degenerados (De Loss et al., 1989).

3.2.4 Produção *in vitro* dos embriões

Para maturação *in vitro* foram utilizados apenas oócitos classificados em grau I, grau II e grau III. Após a classificação os CCOs foram lavados em solução de PBS e 5% soro fetal bovino (SFB) e colocados em criotubos contendo meio de maturação TCM 199 acrescido FSH, LH, 10% de SFBe gentamicina para serem transportados em uma incubadora de oócitos até o laboratório central. No laboratório central foi adicionado óleo mineral aos criotubos e transferidos para estufa a 39° com atmosfera de 5,5% CO_2e umidade saturada e permaneceram por 22-24 horas de acordo com início do processo de maturação na propriedade. Decorrido o período de maturação in vitro (MIV), os oócitos foram transferidos para placas de petri ou Nunc (gotas ou poços, respectivamente) individuais com meio de TALPFerti com heparina e PHE já estabilizado e submerso em óleo mineral. Para a realização da FIV foram utilizadas palhetas de sêmen sexado congelado de 8 touros Jersey, preparados através do gradiente de Percoll. As palhetas foram descongeladas por 20 s em água aquecida a 36°C, e depois adicionadas em eppendorfs contendo as fases de 45 e 90% do gradiente de Percoll, para serem centrifugadas primeiramente por 5 minutos a 3200 rpm, seguido de duas vezes por 3 minutos a 2000 rpm. Após cada centrifugação o sobrenadante foi retirado deixando um depósito de sêmen e adicionado o meio de FIV. A dose inseminante foi de aproximadamente 5 µL com 1 x 10^5 espermatozóides móveis por gota. Após a inseminação das gotas, as placas foram colocadas novamente na estufa a 39°C com 5% CO_2 e umidade saturada por 18 a 22 horas. Considerando o dia da fecundação como dia zero (D0), no dia D1 os prováveis zigotos foram desnudados através de múltiplas pipetagens e lavados em meio SOF (*"Synthetic Oviduct Fluid"*) e levados a estufa até o D7 no meio de cultivo *in vitro* (CIV). No D2 foi avaliada a taxa de clivagem e em D7 o desenvolvimento embrionário, considerando viáveis, os embriões que

estivessem em estágio de desenvolvimento condizentes com o dia do CIV. Os embriões foram classificados conforme os critérios da IETS (Wright, 1998) e somente embriões grau 1 e 2 foram utilizados. Para análise dos resultados, os embriões foram classificados em blastocistos totais (grau 1 e 2) e blastocistos grau 1.

3.2.5 Coletas de sangue

Amostras de sangue foram coletadas nos dias referentes aos momentos de AF (Dias 0, 14, 28 e 42), bem como nos dias 5, 9, 19, 23, 33 e 37 concomitantes à administração do tratamento de acordo com o período experimental (Fig. 2). Desta forma, foram coletadas um total de 10 amostras de sangue de cada animal durante o período de execução de cada experimento. As amostras de sangue foram coletadas antes da aplicação do tratamento em dois tubos sem anticoagulante através de punção do complexo arterio-venoso coccígeo. Imediatamente após a coleta as amostras foram centrifugados a 3000 rpm por 15 min para obtenção do soro, que foi armazenado em duplicata em eppendorfs identificados e congelados a -20°C para posteriores análises bioquímicas.

3.2.6 Análises bioquímicas

As concentrações sanguíneas de fósforo, ureia, colesterol total foram analisadas por ensaio colorimétrico enzimático e quantificadas por um espectrofotômetro semi automático (SB 190®, CELM, São Paulo, Brasil). Os reagentes foram manuseados conforme as instruções do fabricante (Labtest®, Diagnóstica S.A,Lagoa Santa, Brasil). As concentrações séricas de AGNES foram analisadas nos dias referentes a AF (0, 14, 28 e 42) de cada experimento, usando o kit comercial (Randox®, Laboratório Randox, Antrim, Irlanda do Norte) de ensaio enzimático. Os coeficientes de variação foram menores que 10% em todos os ensaios.

3.2.7 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software SAS 9.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). As variáveis foram analisadas pelo

teste de medidas repetidas ao longo de cada experimento, sendo incluso o efeito aleatório da fêmea em todos os modelos. Os efeitos dos tratamentos, coletas e suas interações foram analisados sobre os parâmetros bioquímicos (fósforo, ureia, colesterol total e AGNES) e reprodutivos (n° folículos, oócitos recuperados e viáveis, embriões produzidos). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). O valor de P ≤ 0,05 foi considerado significante e P ≤ 0,10 foi considerado tendência.

3.3 RESULTADOS

As médias de folículos aspirados, oócitos recuperados e viáveis, taxa de clivagem e produção de embriões *in vitro* de acordo com o tratamento com butafosfan e cianocobalamina em cada experimento estão presentes na tabela 1. As concentrações plasmáticas de fósforo, ureia, colesterol total e AGNES de acordo com o tratamento estão expressas na tabela 2.

3.3.1 Experimento 1

Os animais tratados com BTC tiveram uma maior produção de embriões *in vitro* na AF do dia 28 do período experimental (3.0 ± 0.68 vs 1.3 ± 0.71; P = 0.02). As vacas do grupo BTC tiveram uma tendência (P = 0,08) de redução nas concentrações médias de colesterol ao longo do período de avaliação (Tab. 2). Os níveis de colesterol foram menores no grupo BTC nos dia 9 e 42 do período experimental (P = 0,08 e P = 0,004, respectivamente), respectivamente (Fig. 3). Ao longo do período experimental, as vacas lactantes apresentaram maiores (P = 0,03) concentrações de colesterol em comparação as não lactantes (91.0 ± 4.58 vs 78.8 ± 2.47 mg/dL, respectivamente). As vacas lactantes tiveram uma tendência de menor (P = 0.07) ECC em comparação ao controle (2.4 ± 0.42 vs 3.3 ± 0.18, respectivamente). Não foi observado efeito do momento da AF sobre o ECC, entretanto houve uma tendência do ECC no dia 42 ser maior que o dia 28 e dia zero (2.93 ± 0.23, 2.82 ± 0.23 e 2.80 ± 0.23, respectivamente). As concentrações de fósforo, ureia e AGNES não diferiram (P ≥ 0.05) conforme o tratamento e a categoria da vaca (Tab. 2). Além disso, a

categoria da vaca e o touro utilizado para FIV não influenciaram (P ≥ 0.05) os parâmetros reprodutivos avaliados.

3.3.2 Experimento 2

Os animais tratados com BTC tiveram um maior (P ≤ 0.05) número de folículos aspirados (24.4 ± 2.85 vs 15.4 ± 2.36), oócitos recuperados (18.7 ± 3.37 vs 10.04 ± 2.77) e oócitos viáveis (15.23 ± 2.71 vs 8.08 ± 2.22) em relação ao controle, respectivamente, na AF do dia 42 do experimento (Tab. 1). Ao longo do período, as vacas tratadas com BTC tiveram uma tendência (P = 0.07) de maior número de oócitos grau II (3.55 ± 0.49 vs 2.27 ± 0.41) em comparação ao controle (Fig. 4), respectivamente. O número de oócitos grau II foi maior (9.01 ± 2.48 vs 4.48 ± 1.85; P = 0.01) nas vacas tratadas com BTC na AF do dia 42 em relação ao controle, respectivamente. As vacas tratadas com BTC tiveram uma tendência (P = 0.09) de redução dos níveis de AGNES ao longo do período experimental (Tab. 2). Na AF do dia 42, o tratamento com BTC reduziu (P = 0.01) as concentrações de AGNES em comparação ao controle (0.179 ± 0.164 vs 0.728 ± 0.133 mmo/L, respectivamente) (Fig. 5). Ao longo do período experimental as vacas lactantes tiveram uma menor (P = 0.03) concentração de ureia plasmática do que as vacas não lactantes. As vacas lactantes possuíram um menor (P = 0.01) ECC do que às não lactantes (3.12 ± 0.19 vs 4.0 ± 0.20, respectivamente). Ao longo do período, foi observado uma elevação (P = 0.001) do ECC das vacas, onde ECC no dia 42 foi maior (P ≤ 0.05) que os dias 14 e zero do experimento (3.8 ± 0.16, 3.5 ± 0.15 e 3.3 ± 0.15, respectivamente) e o dia 28 foi maior (P = 0.001) que o dia zero (3.7 ± 0.15 vs 3.3 ± 0.15, respectivamente). As concentrações de fósforo, colesterol e AGNES não diferiram (P ≥ 0.05) entre as categorias de vacas. Não foi observado efeito do touro utilizado na FIV sobre os parâmetros reprodutivos avaliados.

3.3.3 Exp. 1 vs Exp. 2

Quando comparados os experimentos, independente dos tratamentos, as concentrações de AGNES do exp. 1 foram maiores (P = 0.04) em relação ao exp. 2 (0.619 ± 0.059 vs 0.4521 ± 0.056 mmol/L, respectivamente). As

concentrações de colesterol foram menores (P = 0.001) no exp. 1 em comparação ao exp. 2 (86.5 ± 3.38 vs 102.9 ± 3.32 mg/dL, respectivamente). O ECC, fósforo e a ureia não diferiram entre os experimentos.

3.4 DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro a demonstrar um efeito benéfico da suplementação de butafosfan e cianocobalamina em vacas taurinas sobre o número de oócitos recuperados e viáveis e a produção *in vitro* de embriões. Até o momento, apenas um estudo conduzido por Reis et al. (2012) havia relatado um incremento no número de estruturas recuperadas, oócitos viáveis e produção de embriões em doadoras da raça Gir tratadas com butafosfan e cianocobalamina. Os resultados do nosso estudo podem auxiliar na maior difusão da biotécnica de PIV de embriões em doadoras de raças taurinas, pois são encontrados resultados inferiores em vacas leiteiras de raças taurinas comparadas a zebuínas, dificultando a disseminação da técnica (Pontes et al., 2009). Historicamente, trabalhos ainda demonstraram que vacas lactantes de alto potencial genético para produção de leite têm uma redução nas taxas de produção de embriões (Snijder et al., 2000; Pontes et al., 2010). Portanto, a suplementação com butafosfan e cianocobalamina proposto nesse estudo se apresenta-se como uma interessante estratégia para incrementar e viabilizar a produção in vitro de embriões em vacas taurinas lactantes ou secas.

A ação sistêmica da combinação de butafosfan e cianocobalamina sobre os tecidos não foi totalmente elucidada. O que já foi devidamente esclarecido é que o fósforo contido na molécula de butafosfan pode atuar na síntese de ATP e participar ativamente da fosforilação de compostos intermediários da gliconeogênese (Rollin et al., 2010). Já a cianocobalamina tem importante papel sobre o bloqueio da lipólise e no aproveitamento dos AGNES no fígado, pois ela ativa o ciclo de Krebs, potencialmente incrementando a gliconeogênese (Rollin et al., 2010). A vit. B12 também é co-fator direto para metionina sintetase, enzima fundamental para a síntese de metionina que interfere diretamente no metabolismo e transporte de gorduras. Assim, de uma forma geral, nossa hipótese foi baseada na síntese de ATP, gliconeogênese e redução dos níveis de AGNES. Além disso, acreditamos numa ação do fósforo

aumentando a fosforilação da MAP quinase (Proteínoquinase ativada por mitógenos), que é uma subfamília de proteínas-quinase específicas de serina/treonina que regula várias atividades celulares, como a expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose (Yan et al., 2012).

Nesse estudo não foram detectados efeitos do tratamento com BTC sobre as concentrações plasmáticas de fósforo. De certa forma, esse resultado era previsto, pois embora tenha ocorrido a suplementação do mineral orgânico periodicamente, o intervalo entre a administração do tratamento e realização das coletas de sangue foi de 4 a 5 dias. Portanto, durante esse período (entre 96 a 120 horas), o organismo do animal já foi capaz de realizar um controle homeostático do mineral circulante. Outros trabalhos que reportaram efeitos da suplementação com BTC também não encontraram incrementos plasmáticos de fósforo (Furll et al., 2010; Rollin et al., 2010). Apesar disso, nesse estudo a definição dos intervalos entre as aplicação do BTC foram baseados nos resultados produtivos benéficos obtidos por Pereira et al. (2013a) em vacas pós parto e no intervalo médio de desenvolvimento de uma nova onda folicular ovariana (5 a 7 dias) (Adams et al., 1992), buscando-se a suplementação desde a emergência da onda folicular e desenvolvimento do oócito até o momento da AF. Assim, com relação ao desenvolvimento da onda folicular, a suplementação objetivou fornecer os efeitos do BTC durante a fase que o pool de folículos emergentes estavam responsivos às gonadotrofinas (Scaramuzzi et al., 2011). Ainda, quando optamos pela execução de um período de 42 dias de tratamento, era esperado algum efeito residual das primeiras aplicações do BTC nos folículos pré-antrais para posteriores AF (dias 28 e 42), pois já foi comprovado que o oócito possuí uma fase de reflexo do plano nutricional de aproximadamente 60 dias (Fair et al., 2010).

Os efeitos positivos do BTC encontrados no exp. 2 sobre o número de folículos aspirados, oócitos recuperados e oócitos viáveis foram às possíveis causas do aumento da produção de embriões por doadora nesse trabalho. Entretanto, nesse exp. não foram observados efeitos do BTC sobre a produção de embriões *in vitro* por doadora. Existe uma alta correlação positiva entre o número de folículos aspirados e número de oócitos recuperados (Seneda et al.,

2001). Um trabalho de Tallam et al. (2005) que alimentou vacas leiteiras com de 0,35% e 0,47% de fósforo na deita observou um incremento no número de folículos médios (de 6 a 9 mm) na dieta com alto fósforo (1,2 vs 1,9 folículos, respectivamente). O mesmo trabalho não observou diferença entre o intervalo do parto a primeira ovulação e na taxa prenhez das vacas de acordo com as diferentes dietas. Além desse efeito, ainda existe a ação combina da cianocobalamina, que otimiza o metabolismo de carboidratos e pode aumentar o aporte de glicose e IGF-I para os folículos, sendo que a glicose é o combustível primário para o ovário (Rabiee et al., 1997) e o IGF-I estimula crescimento e diferenciação celular (Butler et al., 2003). Nesse sentido, o estudo de Preynant et al. (2009) demonstrou que suplementação de Vit. B12 aumentou a glucose plasmática e reduziu o acúmulo de lipídios hepáticos durante o período de transição. Assim, podemos presumir que os efeitos diretos da insulina, glicose e IGF-I tenham atuado em nosso estudo sobre a foliculogênese e desenvolvimento do oócito. Nesse contexto, outros trabalhos mostraram que o número de folículos ovarianos pequenos (<5mm) foi positivamente relacionado com a insulina (Garnsworthy et al., 2008) e negativamente com o glucagon (Garnsworthy et al., 2009). Portanto, como foram encontradas em nosso estudo (exp. 2) menores concentrações de AGNES no dia 42 do período experimental, concomitante ao aumento de folículos e oócitos, e os AGNES possuem relação inversa com a insulina e positiva com o glucagon (Grummer et al., 1995), supomos que esse efeito possa ter sido mediado pelo maior aporte energético apoiado pela suplementação de BTC.

As concentrações de AGNES nas vacas tratadas tenderam a serem menores ao longo do exp. 2, sendo significativamente menor na coleta do dia 42. Esses resultados comprovam nossa hipótese de que BTC pode reduzir os AGNES e aumentar o número e qualidade dos oócitos recuperados. Da mesma forma, também ao longo do exp. 2 as vacas suplementadas apresentaram uma tendência de maior número de oócitos de grau II. Porém, esses efeitos benéficos sobre o número e qualidade dos oócitos não foram capazes de incrementar a produção de embriões por doadora no exp. 2. A ação do BTC sobre a redução dos AGNES e BHB já foi encontrada em outros estudos com

vacas leiteiras no pós parto recente (Furll et al., 2010; Rollin et al., 2010, Pereira et al., 2013a), mas com vacas em terço médio de lactação ou não lactantes, animais do presente estudo, ainda não havia sido relatada. Os efeitos do BTC são fundamentais para esclarecer algumas das possíveis vias de ação dessas substâncias sobre a viabilidade dos oócitos. Logo, como grande parte das alterações metabólicas são refletidas no fluido folicular ovariano, estudos têm demonstrado que elevações nas concentrações de AGNES e BHB são prejudiciais para desenvolvimento da capacitação oocitária e função das células da granulosa (Leroy et al., 2004). Altas concentrações de AGNES são consideradas tóxicas para o tecido ovariano e afetam negativamente a maturação dos oócitos (Jorritsma et al., 2005), taxa de clivagem e produção de blastocistos de vacas (Leroy et al., 2005). O desenvolvimento de embriões e células da granulosa são inferiores em vacas que possuem elevações de BHB e AGNES e redução de glicose (Vanholder et al., 2006). Por fim, acreditamos que a redução dos AGNES no exp. 2 e a possível elevação da glicose em função do tratamento tenham sido os fatores responsáveis parcialmente pelo incremento de número e da qualidade dos oócitos.

Na AF do dia 28 do exp. 1 um maior número de embriões foi produzido pelas vacas suplementadas com BTC. Esses resultados estão de acordo com a nossa hipótese, entretanto nesse período não foram observados efeitos sobre os AGNES, número e qualidade dos oócitos recuperados e viáveis. Primeiramente, esses resultados parecem demonstrar que ação do BTC tenha ocorrido sobre a taxa de produção de blastocisto *in vitro*, pois o número de oócitos para MIV foram semelhantes. Contudo, sabe-se que fatores intrínsecos dos possíveis efeitos do BTC podem ter afetado as taxas de produção de blastocistos sem serem mensurados. Por exemplo, alguns trabalhos com humanos e ratos demonstram a importância do conteúdo de ATP nos oócitos, sendo que o ATP foi considerado crítico para a maturação e sugerido como um forte indicador para predizer o potencial de desenvolvimento do oócito *in vitro* (Van Blerkom et al., 1995). Nesse sentido, o estudo de Stojkovic et al. (2001) demonstrou que, antes da maturação *in vitro*, o conteúdo de ATP nos oócitos grau I tenderam a ser maiores do que grau II e foram significativamente

maiores que grau III e IV (1.8, 1.6, 1.4 e 0.9 pmol de ATP; respectivamente). No mesmo trabalho, o processo de maturação dos oócitos *in vitro* aumentou significativamente o conteúdo de ATP, sendo que oócitos com mais ATP (Grau I) apresentaram posteriormente maiores taxas de produção de embriões *in vitro*. Além desse efeito, ainda recordamos de um possível ação das MAP quinases que, após o desencadeio da quebra da vesícula germinativa (VG) pela ação combinada do FSH, AMPc e MPF (Fator promotor da maturação), atua na fosforilação de diversos substratos incluindo fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto (Roux et al., 2004), sendo essencial em eventos pós rompimento da VG. Assim, as MAP quinases são proteínas consideradas reguladoras do processo de maturação oocitária (Jones et al., 2004). Portanto, supomos que os efeitos benéficos do tratamento com BTC ocorreram mediante a maior disponibilidade de fósforo e ATP afetando o processo de maturação oocitária *in vitro*. Dessa forma, mais estudos são necessários para indicar como o BTC pode atuar sobre a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial.

Ao longo do exp. 1 as concentrações de colesterol tenderam a serem menores no BTC, principalmente no dia 42 do período. O colesterol é um precursor base da esteroidogênese no tecido ovariano e está relacionado com o status energético do animal. No estudo de Pereira et al. (2013a) as concentrações de colesterol também foram reduzidas após o tratamento com BTC. Já em no estudo de Kreipe et al. (2011) o BTC não afetou o colesterol sérico. As vias de relação do BTC ainda não foram muito estudadas, mas supõe-se que essa redução possa ocorrer como resultado de uma diminuição da β-oxidação hepática, reduzindo a secreção de lipoproteínas pelo fígado (Grummer, 1993).

Uma constatação interessante que ocorreu em nosso estudo foram os maiores concentrações de AGNES no exp. 1. Acreditamos que as concentrações de AGNES tenham sido elevadas no exp. 1 devido à oferta alimentar dos animais no período inicial do estudo, pois nesse momento as forrageiras de inverno predominantes nas pastagens ainda apresentam uma menor taxa de crescimento diário, ainda mais com os casos de ressemeadura natural (Mittelmann et al., 2010). Além disso, como a fazenda comercial possui

outras categorias de animais, nessa fase de menor disponibilidade alimentar ocorre um aumento da carga animal nas áreas de pastagens reduzindo o consumo alimentar por animal. Esse moderado consumo alimentar concorda com as variações de ECC observados nas vacas do exp. 1, que aumentaram apenas 0.1 ponto na média de ECC ao longo dos 42 dias de estudo. Da mesma forma, as concentrações de colesterol tenderam a serem menores nas vacas do exp. 1. Em contraste, no exp. 2 as vacas tiveram uma média de aumento de 0.5 pontos no ECC durante os 42 dias do estudo. Sobretudo, ainda podemos observar que algumas respostas ao tratamento foram observadas em apenas um dos experimentos, possivelmente devido a essas variações ocorridas entre os períodos.

3.5 Conclusão

A suplementação com butafosfan e cianocobalamina seriada pode aumentar a produção de embriões *in vitro* de vacas Jersey. Quando a suplementação com butafosfan e cianocobalamina reduziu os AGNES, foi capaz de aumentar o número e a qualidade dos oócitos viáveis. Portanto, os mecanismos de ação do butafosfan e cianocobalamina sobre os oócitos e produção de embriões *in vitro* necessitam de mais estudos para serem esclarecidos.

3.6 Referências

Ali S., Ahmad N., Akhtar N., Zia-Ur-Rahman, Noakes D.E. Metabolite contents of blood serum and fluid from small and large sized follicles in dromedary camels during the peak and the low breeding seasons. Anim. Reprod. Sci. 2008;108:446–456.

Adamiak SJ, Mackie K, Watt RG, Webb R, Sinclair KD. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. Biol. Reprod 2005;73:918–926.

Adams, GP, Matteri, RL, Kastelic, JP, Ginther OJ. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers.

Journal of Reproduction and Fertility 1992;94;177-188.

Berg JM, Tymoczko JL and Stryer L.Glycolysis and gluconeogenesis. In Biochemistry, 6th edition (ed. JM Berg, JL Tymoczko and L Stryer), 2006 pp. 433–474.W. H. Freeman and Co., New York, NY.

Butler ST, Marr AL, Pelton SH, Radcliff RP, Lucy MC, Butler WR. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: Effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. J. Endocrinol 2003;176:205–217.

Cunningham JG. Text book of Veterinary Physiology.2002, 3rd ed. W.B. Saunders, Philadelphia, PA.

De Loss de F, Van Vliet C., Van Maurik, P, KRUIP TAM. Morphology of immature bovine oocytes. Gamete Research 1989;24197-204.

Dryden LP and Hartman AM. Effects of vitamin b12 on the weights of certain organs in the rat. The Journal of Nutrition 1966;90:377-381.

European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA) 2000 Veterinary Medicines and Information Technology Unit. EMEA/MRL/734/00 FINAL, p 1–2. EMEA, London, UK

Fair T. Mammalian oocyte development: Checkpoints for competence.Reprod. Fertil. Dev.2010;22:13–20.

Gong JG, Lee WJ, Garnsworthy PC, Webb R. Effect of dietary induced increases in circulating insulin concentrations during the earlypostpartum period on reproductive function in dairy cows.Reproduction 2002;123:419–427.

Grummer RR. Etiology of lipid related metabolic disorders in periparturient dairy cows. Journal of Dairy Science 1993;76:3882–96.

Grummer, RR. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. J. Anim. Sci. 1995;73:2820–33.

Jones KT. Turning it on and off: M-phase promoting fator during meiotic maturation and fertilization. Molecular Human Reproduction 2004;10:1-5.

Jorritsma R, Langendijk P, Kruip TA, Wensing TH, Noordhuizen JP. Associations between energy metabolism LH pulsatility and first ovulation in early lactating cows.Reprod. Domest. Anim. 2005;40:68–72.

Kreipe L, Deniz A, Bruckmaier RM, Van Dorland HA. First report about the mode of action of combined butafosfan and cyanocobalamin on hepatic

metabolism in nonketotic early lactating cows. J Dairy Sci. 2011;94(10):4904-14.

Leroy JL, Vanholder T, Bols PE, De Clercq J, Van Soom A. The effect of negative energy balance associated non-esterified fatty acid levels during in vitro maturation of bovine oocytes on embryo production. In: Proceedings of 20th scientific meeting of the European Society of Embryo Transfer, 10th–11th September 2004. France: Lyon. p. 144.

Leroy JLMR, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, Kruif A, Genicot G, Van Soom A. Nonesterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. Reproduction 2005;130:485–95.

Martins CF. O impacto da transferência de embriões (TE) e da fecundação in vitro (FIV) na produção de bovinos no Brasil. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/243/>. Acesso em: 25 out. 2010.

Mgongo FOK, Gombe S, OGAA JS. The influence of cobalt/vitamin B12 deficiency as a stressor affecting adrenal cortex and ovarian activities in goats. Reprod. Nutr. Dévelop. 1984;24(6):845-854.

Mittelmann A, Montardo DP, Castro CM, Nunes CDM, Buchweitz ED, Corrêa BO. Caracterização agronômica de populações locais de azevém na Região Sul do Brasil, Ciência Rural, Santa Maria,2010;40(12):2527-33.

Preynat A, Lapierre H, Thivierge MC, Palin MF, Matte JJ, Desrochers A and Girard CL 2009. Effects of supplements of folic acid, vitamin B12, andrumen-protected methionine on whole body metabolism of methionineand glucose in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 92, 677–689.

Pereira RA, Silveira PAS, Montagner P, Schneider A, Schmitt E, Rabassa V, Pfeifer LFM, Del Pino FAB, Pulga ME, Corrêa MN. Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk production in dairy cows.Animal 2013a; 7(7):1143-7.

Pereira RA, Fensterseifer S, Barcelos VB, Martins CF, Schneider A, Schmitt E, Pfeifer LFM, Del Pino FAB, Corrêa MN. Metabolic parameters and dry matter

intake of ewes treated with butaphosphan and cyanocobalamin in the early postpartum period. Small Ruminant Research 2013b;114:140-145.

Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (Bos indicus) donor cows. Theriogenology 2009;71:690 –7.

Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GMG, Sanches BV, Porcionato JPF, Vieira PHS, Faifer FS, Sterza FAM, Schenk JL, Seneda MM. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from Bos taurus, Bos indicus, and indicus-taurus dairy cows using sexed sperm. Theriogenology 2010;74:1349 –55.

Rollin E, Berghaus RD, Rapnicki P, Godden SM and Overton MW. The effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum beta-hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle. Journal of Dairy Science 2010;93:978–987.

Rabiee AR, Lean IJ, Gooden JM, Miller BG, Scaramuzzi RJ. Anevaluation of transovarian uptake of metabolites using arterio-venous difference methods in dair y cattle. Anim.Reprod. Sci. 1997;48:9–25.

Reis PO, Martins CM, Sales JNS, Pulga ME, Brandeburgo ES, Duran M, Vieira LM, Baruselli PS. Effect of the supplementation with injectable tonic, organic phosphorus based associated with vitamin B12 (B12 Catosal ®) in the in vitro embryo production of Gyr donors. Proceedings of the 26th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE).Anim Reprod 2012;9(3):562 (abstract).

Rizos D, Lonergan P, Ward F, Duffy P, Boland MP. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. Molecular Reproduction and Development 2002;61:234-48.

Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. Microbiology and Molecular Biology 2004;68:320-344.

Seneda MM, Esper CR, Garcia JM. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. Anim. Reprod. Sci. 2001;67:37-43.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and develop-mental capacity after in vitro fertilization and culture. Biol Reprod 2001;64:904–9.

Stroud B. IETS Statistics and Data Retrieval Committee Report. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. IETS Newslett 2011;29(4):14-23.

Taoka S, Padmakumar R, Lai M, Liu H, Banerjee R. Inhibition of the human methylmalonyl-CoA mutase by various CoA esters. J. Biol. Chem.1994;269:31630–34.

Thibier M. Transfers of both in vivo -derived and in vitro pro-duced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. IETS Embryo Transfer Newsletter 2006;24:11–9.

Snijders SE, Dillon P, O'Callaghan D, Boland MP. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. Theriogenology 2000;53:981–9.

Van Blerkom J, Davis P, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in vitro fertilization and embryo transfer. Hum Reprod 1995; 10:415–424.

Vanholder T, Leroy JL, Van Soom A, Coryn M, Kruif A, Opsomer G. Effects of beta-OH butyrate on bovine granulosa and theca cell function in vitro. Reprod. Domest. Anim 2006;41:39–40.

Wright J. Photomicrographic illustration of embryo codes. Manual of the International Embryo Transfer Society, Savory IL (3rd ed). International Embryo Transfer Society 1998;167–70.

Yan L, Luo H, Gao X, Liu K, Zhang Y. Vascular endothelial growth factor-induced expression of its receptors and activation of the MAPK signaling pathway during ovine oocyte maturation in vitro. Theriogenology 2012;78:1350–60.

Tabela 1. Médias (± EPM) dos parâmetros reprodutivos de 4 sessões de aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões de vacas Jersey tratados com 4500 mg de butafosfan e 2,25 mg de cianocobalamina (grupo BTC, n = 9) ou placebo (NaCl 0,9%, n = 9) durante o período de 42 dias.

	Tratamento		Valor de P		
Item	Controle	BTC	Trat	Coleta	Trat*Coleta
Experimento 1					
Folículos AF	17.2 ± 3.19	17.1 ± 2.88	0.96	0.08	0.06
<3 mm	13.0 ± 2.54	11.8 ± 2.50	0.74	0.7	0.21
3-6 mm	2.26 ± 0.39	3.0 ± 0.36	0.18	0.08	0.9
7-10 mm	0.82 ± 0.28	1.21 ± 0.26	0.3	0.07	0.06
11-13 mm	0.49 ± 0.15	0.34 ± 0.14	0.47	0.66	0.11
>13 mm	0.50 ± 0.15	0.59 ± 0.14	0.66	0.01	0.92
Óocitos recuperados	10.3 ± 2.65	10.3 ± 2.37	0.98	0.06	0.28
Tx. Recuperação, %	56.1 ± 4.5	54.5 ± 5.2	0.78	0.04	0.91
Oócitos viáveis	9.2 ± 2.30	9.5 ± 2.06	0.91	0.13	0.65
Clivados (dia 2)	5.1 ± 0.87	3.9 ± 0.93	0.28	0.09	0.89
Blastocistos totais	1.25 ± 0.56	2.1 ± 0.49	0.17	0.71	0.51
Blastocistos GI	1.1 ± 0.59	1.9 ± 0.52	0.15	0.26	0.5
Experimento 2					
Folículos AF	16.4 ± 1.80	19.8 ± 2.11	0.24	0.04	0.04
<3mm	12.0 ± 1.70	14.0 ± 1.91	0.48	0.37	0.50
3-6 mm	3.08 ± 0.57	3.85 ± 0.65	0.39	0.59	0.22
7-10 mm	0.62 ± 0.17	0.87 ± 0.19	0.33	0.03	0.46
11-13 mm	0.42 ± 0.12	0.51 ± 0.13	0.64	0.01	0.21
>13 mm	0.67 ± 0.16	0.56 ± 0.18	0.63	0.63	0.99
Óocitos recuperados	11.0 ± 1.86	15.11 ± 2.21	0.17	0.32	0.49
Tx recuperação, %	62.3 ± 6.2%	71.4 ± 5.6%	0.23	0.93	0.74
Oócitos viáveis	9.27 ± 1.45	12.5 ± 1.73	0.16	0.18	0.47
Clivados (dia 2)	4.45 ± 0.87	3.25 ± 1.01	0.27	0.03	0.82
Blastocistos totais	3.09 ± 0.59	2.18 ± 0.77	0.29	0.13	0.51
Blastocistos GI	1.62 ± 0.32	1.24 ± 0.39	0.4	0.18	0.51

Tabela 2. Médias (± EPM) de fósforo, ureia, colesterol e AGNES de vacas Jersey tratados com 4500 mg de butafosfan e 2,25 mg de cianocobalamina (grupo BTC, n = 9) ou placebo (NaCl 0,9%, n = 9) durante o período de 42 dias submetidas a 4 sessões de AF e PIV.

	Tratamento		Valor de P		
	Controle	BTC	Trat	Coleta	Trat*Coleta
Experimento 1					
Fósforo (mg/dL)	5,7 ± 0,16	5,5 ± 0,15	0.31	0.0001	0.08
Ureia (mg/dL)	47.6 ± 2.81	44.1 ± 2.73	0.34	0.0001	0.46
Colesterol (mg/dL)	89.1 ± 3.41	80.7 ± 3.38	0.08	0.0002	0.39
AGNE	0.547 ± 0.124	0.628 ± 0.109	0.58	0.66	0.87
Experimento 2					
Fósforo (mg/dL)	5,7 ± 0,2	5,7 ± 0,17	0.96	0.0001	0.24
Ureia (mg/dL)	46,9 ± 3,18	44.9 ± 2.65	0.63	0.001	0.86
Colesterol (mg/dL)	102.4 ± 5.86	113.5 ± 4.88	0.16	0.001	0.87
AGNE	0.524 ± 0.065	0.353 ± 0.076	0.09	0.11	0.13

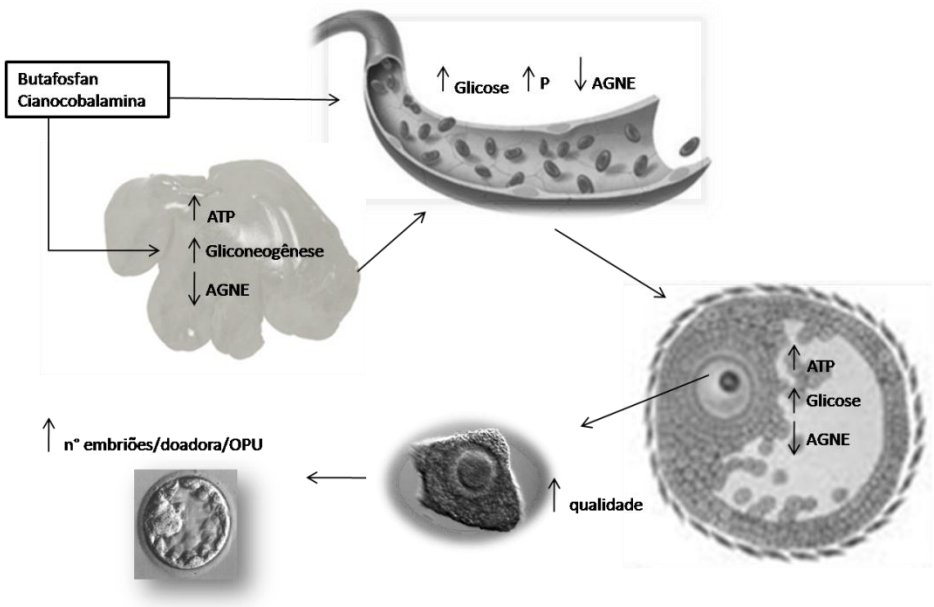

Figura 1. Esquema ilustrando a hipótese do estudo através das interações metabólicas provocadas pela suplementação com BTC.

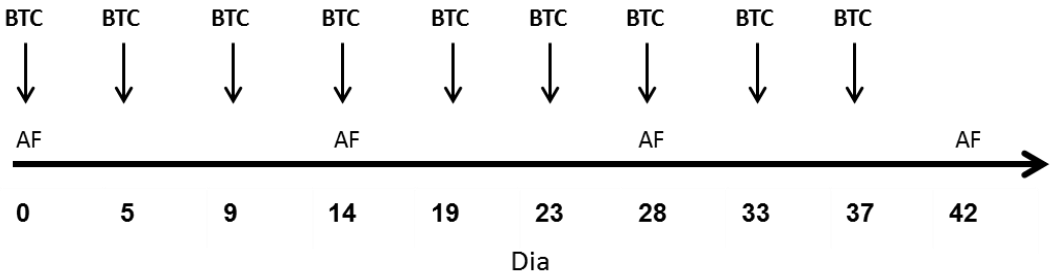

Figura 2. Protocolo experimental demonstrando o período de tratamento com butafosfan e cianocobalamina (grupo BTC, n = 9) e aspirações foliculares. O grupo controle (n = 9) que recebeu aplicação im de placebo (NaCl 0,9%). AF = Aspiração folicular; BTC = administração de 4500 mg de butafosfan e 2,25 mg cianocobalamina.

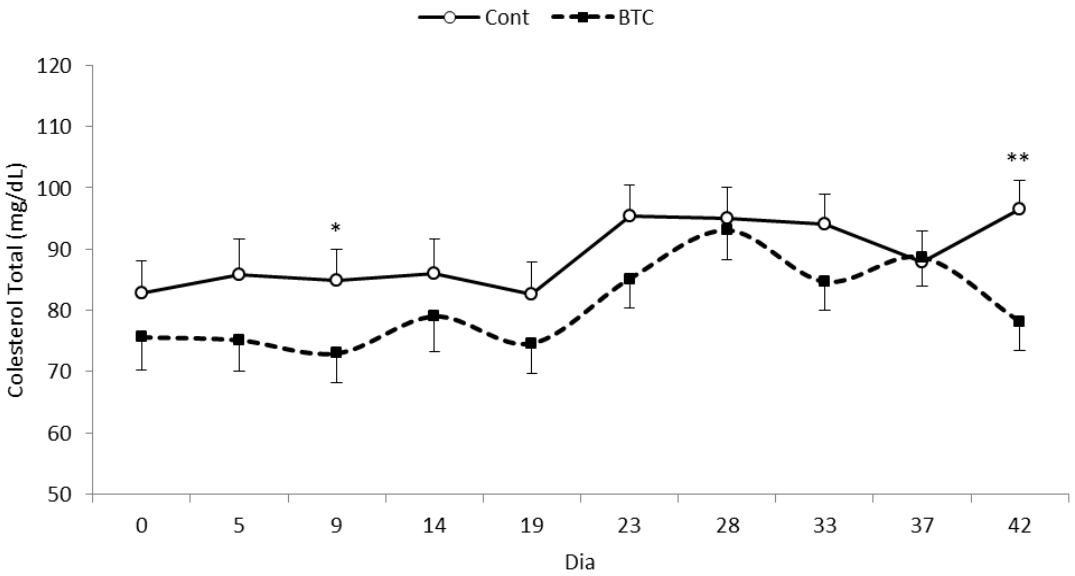

Figura 3. Concentrações séricas de colesterol de vacas tratadas com 4500 mg de butafosfan e 2,25 mg de cianocobalamina (grupo BTC, n = 9) ou controle (NaCl 0,9%, n = 9) durante 42 dias do experimento 1.

*P < 0.10; **P<0.05

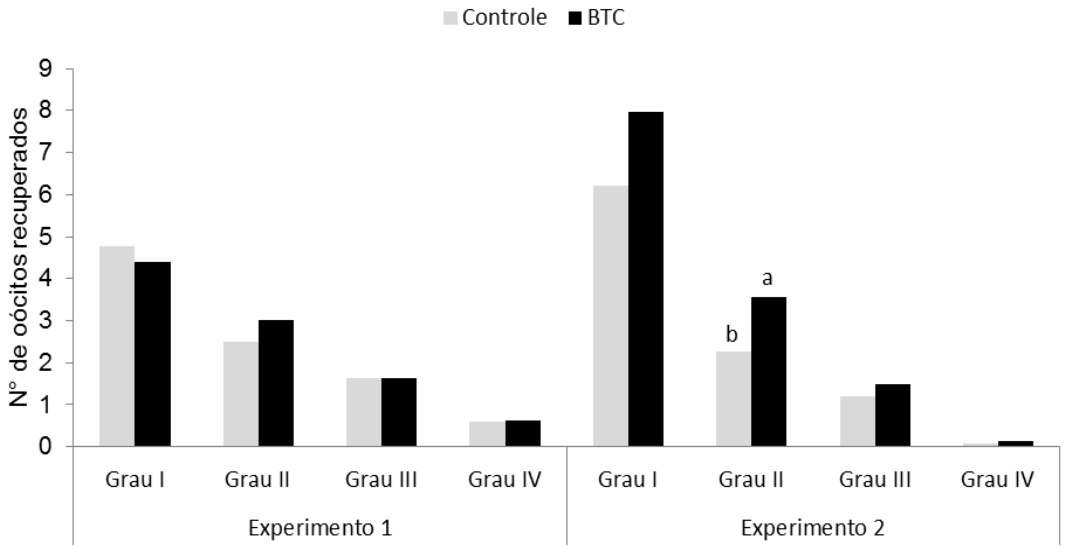

Figura 4. Distribuição dos oócitos pelo grau de qualidade de acordo com tratamento com 4500 mg de butafosfan e 2,25 mg de cianocobalamina (grupo BTC, n = 9) ou controle (NaCl 0,9%, n = 9) durante o período de 42 dias de cada experimento.

[a-b] indica diferença significativa entre os grupos

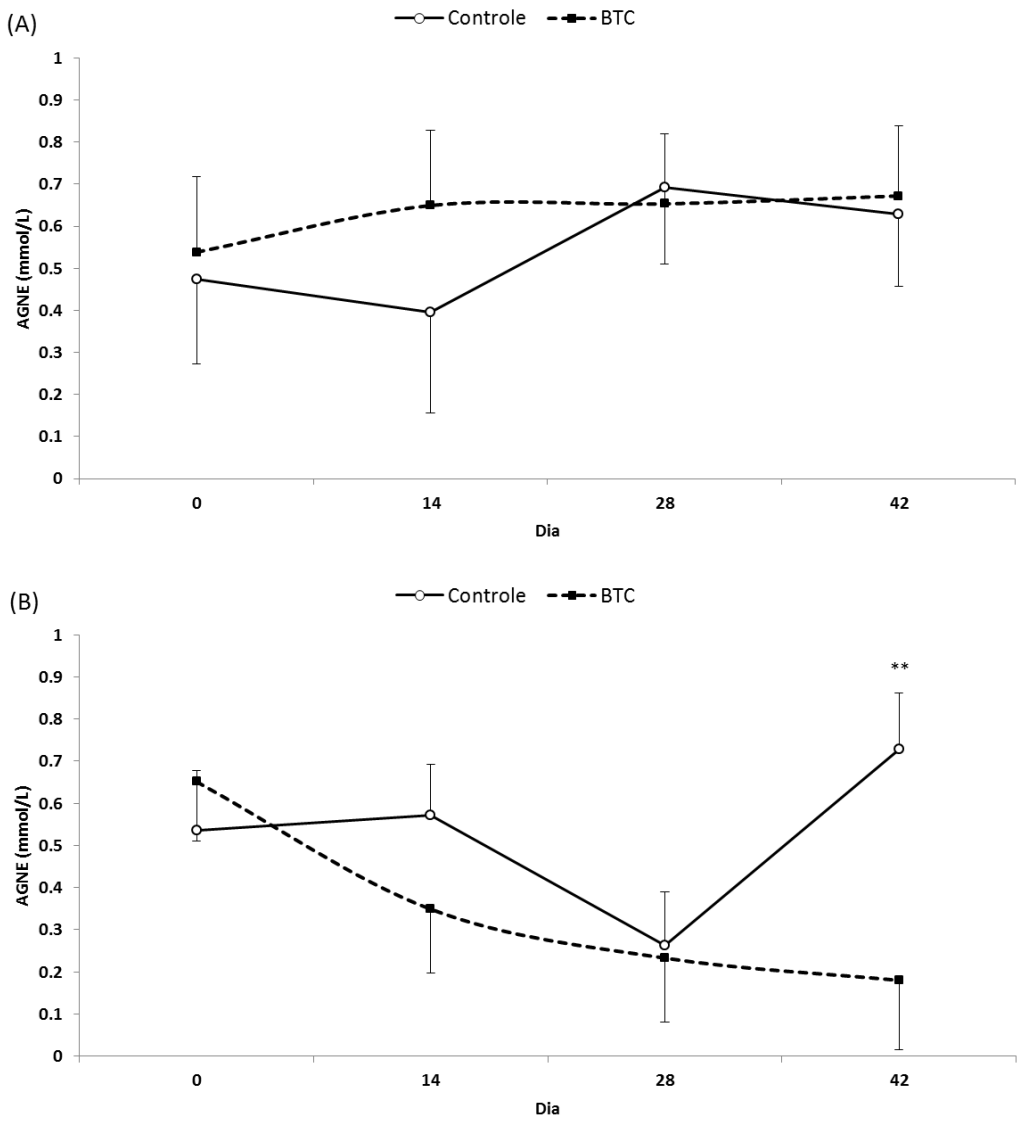

Figura 5. Concentrações séricas de AGNES de vacas tratadas com 4500 mg de butafosfan e 2,25 mg de cianocobalamina (Grupo BTC, n = 9)ou placebo (NaCl 0.9%, n = 9) durante o período de 42 dias do *exp. 1* (A) ou *exp. 2* (B).

******P = 0.01

4 CONCLUSÃO GERAL

A suplementação com butafosfan e cianocobalamina seriada aumenta a produção de embriões *in vitro* de vacas Jersey sem obrigatoriamente afetar os AGNES circulantes. Quando a suplementação com buafosfan e cianocobalamina reduziu os AGNES, foi capaz de aumentar o número e a qualidade de oócitos viáveis recuperados. Portanto, os mecanismos de ação do butafosfan e cianocobalamina sobre os oócitos e produção de embriões *in vitro* necessitam de mais estudos para serem esclarecidos.

6 REFERÊNCIAS

BERG, J.M., TYMOCZKO, J.L., STRYER, L.. Glycolysis and gluconeogenesis. In: BERG, J.M., TYMOCZKO, J.L., STRYER, L. (Eds.), **Biochemistry.** sixth ed. W.H. Freeman and Co., New York, NY, pp. 433–474, 2006.

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

CUNNINGHAM, J. G. **Text book of Veterinary Physiology**. 3rd ed. W.B. Saunders, Philadelphia, PA, 2002.

EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS (EMEA). **Veterinary Medicines and Information Technology Unit. EMEA**/MRL/734/00 FINAL, p 1–2. EMEA, London, UK, 2000.

KREIPE, L.; DENIZ, A.; BRUCKMAIER, R.M.; VAN DORLAND,H.A..First report about the mode of action of combined butafosfan and cyanocobalamin on hepatic metabolism in nonketotic early lactating cows. **J DairySci,** v.94, n. 10, p. 4904-4914, 2011.

MARTINS, C. F. O impacto da transferência de embriões (TE) e da fecundação in vitro (FIV) na produção de bovinos no Brasil. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, 2010.

PONTES, J.H.F.; NONATO JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO S.; BARREIROS. T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA MM. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (Bosindicus) donor cows.**Theriogenology**v. 7, p. 71-690, 2009.

PEREIRA, R.A.; SILVEIRA, P.A.S.; MONTAGNER, P.; SCHNEIDER, A.; SCHMITT, E.; RABASSA, V.; PFEIFER, L.F.M.; DEL PINO, F.A.B.; PULGA, M.E.; CORRÊA, M.N.. Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on

postpartum metabolism and milk production in dairy cows. **Animal,** v. 7, n.7, p.1143-1147, 2013a.

PEREIRA, R.A.; FENSTERSEIFER, S.; BARCELOS, V.B.; MARTINS, C.F.; SCHNEIDER, A.; SCHMITT, E.; PFEIFER, L.F.M.; DEL PINO, F.A.B.; CORRÊA, M.N.. Metabolic parameters and dry matter intake of ewes treated with butaphosphan and cyanocobalamin in the early postpartum period. **Small Ruminant Research**,v. 114, p. 140-145, 2013b;.

PONTES, J.H.F.; SILVA, K.C.F.; BASSO, A.C.; RIGO, A.G.; FERREIRA, C.R.; SANTOS, G.M.G.; SANCHES, B.V.; PORCIONATO, J.P.F.; VIEIRA, P.H.S.; FAIFER, F.S.; STERZA, F.A.M.; SCHENK, J.L.; SENEDA, M.M..Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from Bostaurus, Bosindicus, and indicus-taurus dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**,v.74, p.1349–1355, 2010.

ROLLIN, E.; BERGHAUS, R.D.; RAPNICKI, P.; GODDEN, S.M. AND OVERTON, M.W.The effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum beta-hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle.**Journal of Dairy Science,** v. 93, p. 978–987,2010.

STROUD B. IETS Statistics and Data Retrieval Committee Report.**The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals.** IETS Newslett, v. 29, n.4, p. 14-23,2011.

TAOKA, S.; PADMAKUMAR, R.; LAI, M.; LIU,H. AND BANERJEE, R..Inhibition of the human methylmalonyl-CoA mutase by various CoA esters.**J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 31630–31634, 1994.

WILSON, R. D.; FRICKE,P.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; RUTLEDGE, J. J; PENFIELD, C.M. AND WEIGEL, K.A..In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm.**Theriogenology,** v. 65, p. 1007–1015, 2006.

XU, J.; GUO, Z.; SU, L.; NEDAMBALE, T.L.; ZHANG, J.; SCHENK, J.; MORENO, J.F.; DINNYÉS, J.F.; JI, W.; TIAN, X.C.; YANG, X.; DU, F.;Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. **J Dairy Sci**, v. 89, 2510– 2518, 2006.