

# **FERTILIDADE REDUZIDA EM VACAS LEITEIRAS DE ALTA PRODUÇÃO: RISCO PARA O OVÓCITO E PARA O EMBRIÃO? PARTE II**

## **MECANISMOS QUE CORRELACIONAM NUTRIÇÃO E DIMINUIÇÃO DA QUALIDADE DE OVÓCITOS E EMBRIÕES EM VACAS LEITEIRAS DE ALTA PRODUÇÃO**

*JLMR Leroy<sup>1</sup>, A Van Soom<sup>2</sup>, G Opsomer<sup>2</sup>, IGF Goovaerts<sup>1</sup> e PEJ Bols<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Laboratory for Veterinary Physiology, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Biomedical, Pharmaceutical e Veterinary Sciences, University of Antwerp, Wilrijk; <sup>2</sup>Department of Reproduction, Fertility e Herd Health, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium*

### **INTRODUÇÃO**

Como a fertilidade de vacas leiteiras tem apresentado declínio desde meados da década de 80, inúmeros estudos científicos foram conduzidos, tendo elucidado importantes aspectos da patogenia da síndrome da subfertilidade. A piora da qualidade de ovócitos e embriões é comprovadamente um importante fator que contribui para as amplamente descritas baixas taxas de concepção e na alta prevalência de mortalidade embrionária precoce. Além da importância do balanço energético negativo (BEN) e das alterações endócrinas e metabólicas decorrentes, mais atenção tem sido dada ao efeito de dietas que promovem maior rendimento leiteiro, ricas em energia e proteína. Dietas com alto teor de amido podem aumentar a disponibilidade de energia e a atividade ovariana no período pós-parto imediato, mas podem comprometer a qualidade do ovócito e do embrião por seu efeito insulínogênico. A suplementação de gordura tem efeito contraditório semelhante, estimulando a produção ovariana de esteróides e alterando o metabolismo de energia do ovócito e do embrião, com acúmulo excessivo de lipídeos. Dietas com altos teores de proteína podem elevar as concentrações de amônia e uréia no sangue, levando a alterações do ambiente no folículo, oviduto e útero. Ovócitos e embriões são extremamente sensíveis a tais alterações em seu microambiente, que possivelmente resultam em efeito negativo sobre a maturação, fertilização ou clivagem inicial. Já foram propostos diversos mecanismos relacionados à nutrição que podem afetar a qualidade de ovócito e/ou embrião de vacas leiteiras modernas, até mesmo muito depois do período de BEN e serão discutidos neste trabalho.

### **INTRODUÇÃO**

Estudos conduzidos ao longo das duas últimas décadas formaram um vasto corpo de conhecimentos sobre a correlação entre nutrição e fertilidade de ruminantes (consultar revisão de Robinson et al. 2006). A fertilidade de vacas leiteiras tem apresentado declínio e, além do balanço energético negativo (BEN), acredita-se que as dietas com altos teores de proteína e energia também podem afetar de maneira adversa o processo finamente regulado de estabelecimento da prenhez (Butler 2003). Alterações nutricionais podem afetar de maneira significativa e imediata uma série de fatores humorais, que por sua vez alteram vias de sinalização endócrina e metabólica que são fundamentais para a função dos mecanismos reprodutivos (O'Callaghan et al. 2000; Boland et al. 2001; Diskin et al. 2003). As vacas leiteiras modernas são tipicamente alimentadas com dietas ricas em amido, gordura ou proteína para maximizar a produção de leite. No presente trabalho, discutiremos alguns dos possíveis mecanismos através dos quais tais dietas podem interferir com a qualidade do ovócito e/ou embrião. Afinal, já foi claramente demonstrado que a competência do ovócito ou do embrião em estabelecer uma gestação a termo está reduzida em vacas leiteiras em lactação, em

comparação a vacas secas (Wiltbank et al. 2001; Sartori et al. 2002). Além disso, resultados de trabalhos anteriores sugerem que, mesmo sem considerar o BEN, as adaptações metabólicas para a manutenção de altos níveis de produção de leite e provavelmente as típicas dietas de lactação podem contribuir para a produção de embriões de qualidade inferior, mais escuros e com maior teor de lipídeos (Leroy et al. 2005a). A maior parte dos estudos que correlacionam nutrição e fertilidade descreve a influência de alterações de curto prazo no padrão de consumo sobre diversos parâmetros de fertilidade. Grande parte destes estudos procura definir uma dieta ideal para estimular respostas superovulatórias para maior rendimento de ovócitos ou embriões. Os resultados destes estudos, portanto, são de valor limitado para elucidar a situação específica das vacas leiteiras de alta produção, que recebem as dietas de estímulo da produção de leite por vários meses e não são normalmente submetidas a tratamentos de superovulação. Além disso, vacas leiteiras recém-paridas são raramente usadas em tais desenhos experimentais, devido à produção de leite e ao período de BEN durante as primeiras 5–10 semanas, pois podem confundir os possíveis efeitos da nutrição sobre a fertilidade. Portanto, há disponibilidade muito limitada de literatura sobre os efeitos de longo prazo das dietas de promoção da produção de leite sobre fertilidade e, mais especificamente, sobre a qualidade de ovócitos e embriões no período pós-parto imediato.

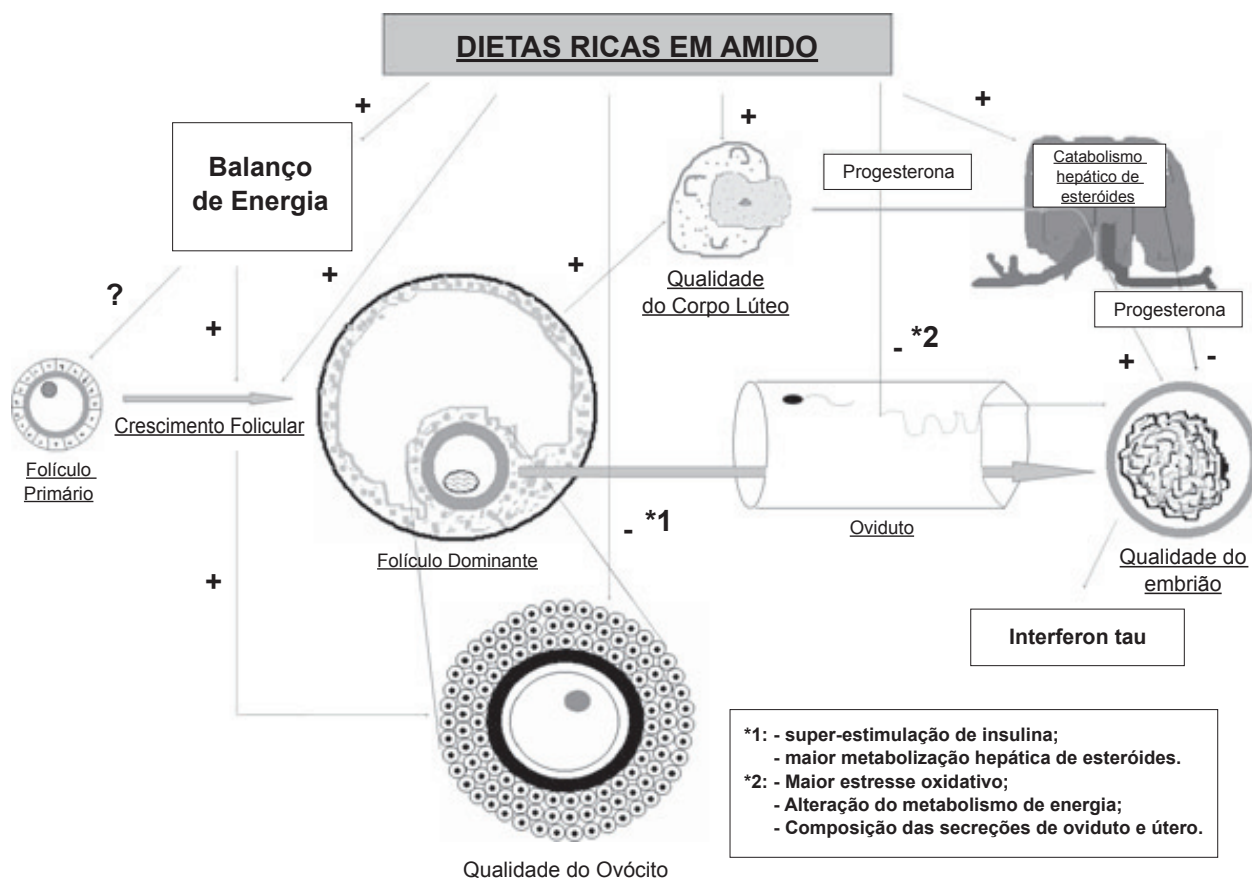
## DIETAS RICAS EM AMIDO PARA ELEVAR O CONSUMO DE ENERGIA

Na tentativa de reduzir a intensidade e a duração do BEN, vacas leiteiras são alimentadas com dietas ricas em energia (geralmente baseadas em alto teor de amido). Estas dietas ricas em energia (ou dietas insulínogênicas ou glicogênicas) podem atenuar a severa queda nos níveis de insulina e glicose ou podem evitar acúmulo de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) durante o período de BEN (Van Knegsel et al. 2007a). Já foi claramente demonstrado que dietas glicogênicas são benéficas para a fertilidade, uma vez que estimulam a retomada da sinalização endócrina normal que leva à retomada da atividade ovariana (Gong 2002; Van Knegsel et al. 2005). Desta forma, pode-se evitar o possível efeito negativo direto de níveis elevados de AGNEs e da hipoglicemia sobre o ovócito e as células da granulosa (Leroy et al. 2005b; Vanholder et al. 2005; Leroy et al. 2006).

Várias semanas após o parto, quando as vacas retornam a um estado de balanço energético positivo, o nível de consumo de energia pode afetar a dinâmica folicular e as concentrações de esteróides e fatores de crescimento na circulação (consultar revisão de O'Callaghan e Boland 1999; Webb et al. 2004), o que pode afetar a qualidade de ovócito e embrião de forma direta ou indireta (Figura 1). Além dos efeitos favoráveis sobre o balanço de energia, alto plano nutricional eleva o fluxo sanguíneo hepático e intensifica o catabolismo de esteróides no fígado, o que por um lado resulta em redução dos níveis séricos de progesterona (Vasconcelos et al. 2003), mas também pode resultar em maior produção de progesterona pelo corpo lúteo (CL; Armstrong et al. 2001). Os relatos na literatura sobre uma possível correlação causal entre consumo de energia, concentrações periféricas de progesterona e viabilidade do embrião são contraditórios (Abecia et al. 1997; Dunne et al. 1999; McEvoy et al. 2001; Lozano et al. 2003) e necessitam ser estudados em maior profundidade.

Wrenzycki et al. (2000) demonstraram mais especificamente que tanto a fonte de energia quanto sua quantidade tem efeitos significativos na expressão de importantes genes de desenvolvimento em embriões, tais como: Cu/Zn super-óxido dismutase (SOD; prevenção de stress oxidativo) e na utilização de piruvato em embriões bovinos de 6 dias. O consumo *ad libitum* de concentrados à base de cevada, em condições experimentais, reduziu a utilização de piruvato e elevou significativamente a expressão de Cu/Zn SOD em embriões. Yaakub et al. (1999a) observaram efeitos adversos semelhantes sobre a qualidade do embrião com o fornecimento de dieta concentrada à base de cevada e com baixo teor de fibra, fornecida antes da superovulação e coleta de embriões. É possível que a mudança no perfil de ácidos graxos voláteis no rúmen

tenha sido induzida pela dieta (propionato vs acetato), afetando indiretamente a qualidade do embrião através da alteração do metabolismo de energia [concentrações de insulina e/ou fator de crescimento I semelhante à insulina (IGF-I)] ou diretamente através de alterações da composição do fluido folicular, tubário ou uterino (Wrenzycki et al. 2000). Esta é uma observação interessante, pois nossas modernas vacas leiteiras são tipicamente alimentadas com dietas ricas em concentrado e pobres em fibras.



**Figura 1.** Representação diagramática dos principais mecanismos através dos quais dietas ricas em amido podem afetar a qualidade do ovócito e do embrião em vacas leiteiras de alta produção. As dietas com alto teor de amido tem efeito glicogênico sobre o balanço de energia, promovendo o crescimento folicular e a produção de esteróides, com efeito positivo sobre a qualidade do ovócito. Um folículo sadio resulta em um corpo lúteo funcional, que produz níveis adequados de progesterona e é capaz de sustentar a fase inicial da gestação.

Existe um corpo crescente de evidências que sugere que os possíveis efeitos adversos das dietas ricas em energia sobre o desenvolvimento embrionário possam ser programados até mesmo antes da fertilização, durante a aquisição de competência pelo ovócito em desenvolvimento no folículo (O'Callaghan e Boland 1999; McEvoy et al. 2001; Lozano et al. 2003). Ovócitos coletados de novilhas (McEvoy et al. 1997a; Nolan et al. 1998; Yaakub et al. 1999b) ou ovelhas (Lozano et al. 2003) que haviam sido alimentadas com dietas com baixo teor de energia demonstraram melhor desenvolvimento in vitro. Ainda existe a discussão quanto ao envolvimento de alterações das concentrações de progesterona pré- e/ou pós-ovulatórias decorrentes da nutrição na qualidade do ovócito (McEvoy et al. 1995; Yaakub et al. 1999b). A partir do acima exposto, fica claro que a interação entre alteração na secreção de esteróides no ovário e metabolização hepática de esteróides induzida pela nutrição é difícil de ser esclarecida e fica difícil avaliar in vivo o efeito isolado de cada um destes fatores sobre a qualidade do ovócito.

Como explicado acima, níveis adequados de insulina e IGF-I são benéficos para o crescimento folicular

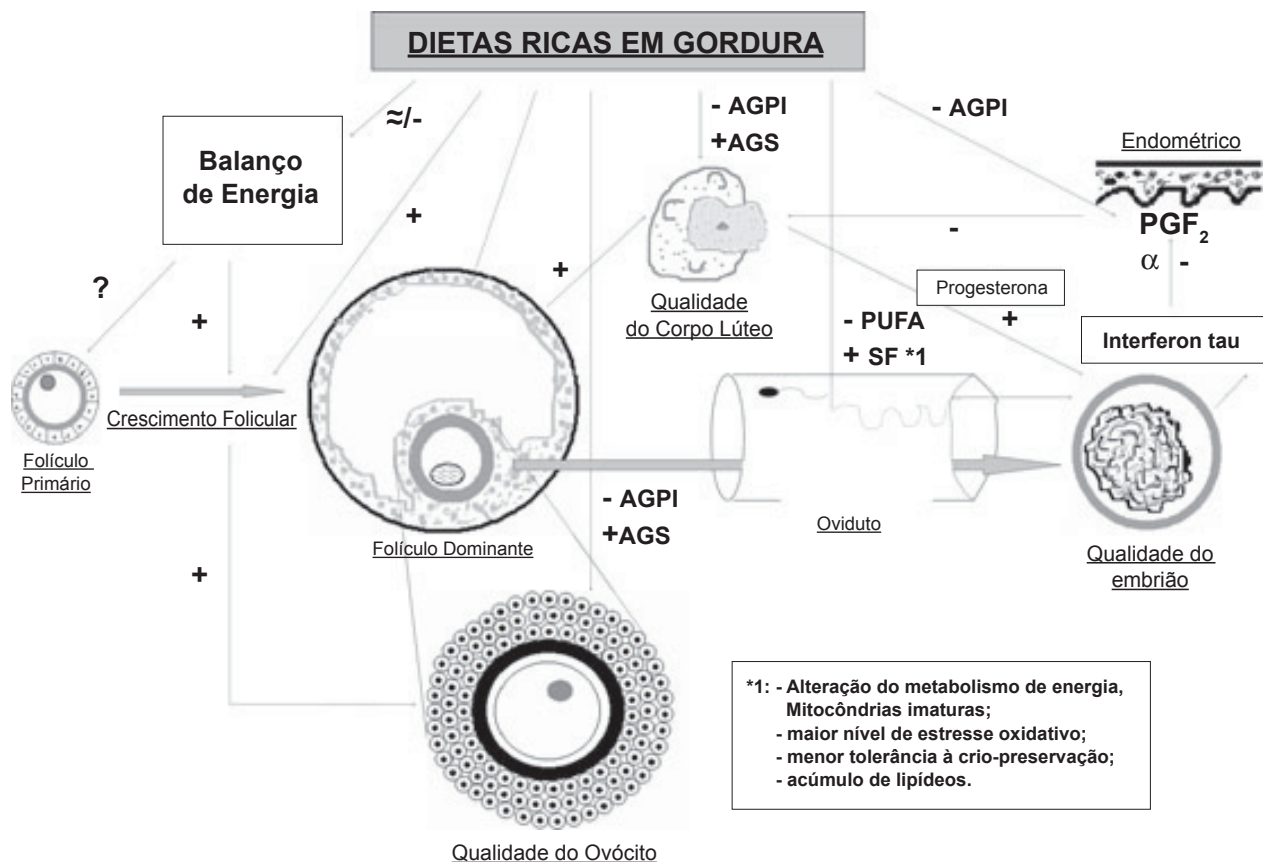
(Landau et al. 2000; Armstrong et al. 2002a). Entretanto, a maior biodisponibilidade de IGF-I intra-folicular induzida pela dieta, através da redução dos níveis da proteína de ligação de IGF (IGFBP), tem o potencial de interagir diretamente com o ovócito (Armstrong et al. 2001; Comin et al. 2002). Entretanto, uma superestimulação do ovócito por altos níveis de IGF-I induzidos pela dieta e provavelmente o aumento associado nas concentrações de insulina podem ter efeito negativo sobre o desenvolvimento de competência pelo ovócito (Armstrong et al. 2002b). É importante mencionar que o nível de consumo de energia estimula a secreção de estrógenos pelas células da granulosa, resultando em efeito benéfico sobre a qualidade do ovócito (Armstrong et al. 2002c; Comin et al. 2002). Todos os mecanismos acima descritos estão representados no diagrama da Figura 1.

Finalmente, um estudo recente de Adamiak et al. (2005a) demonstrou que o efeito da nutrição sobre a qualidade do ovócito é dependente da condição corporal do animal. Um alto plano de ingestão de energia é comprovadamente benéfico para os ovócitos de vacas magras, mas é prejudicial para os ovócitos de vacas de condição corporal moderadamente alta (mais gordas). Desta forma, pode-se concluir que o nível de nutrição (teor de energia) que o animal recebe tem o potencial de influenciar a competência de seus ovócitos em desenvolvimento e subsequente viabilidade do embrião de forma direta e/ou indireta. Os mecanismos acima descritos incluem alterações em concentrações de progesterona, estrógeno, IGF e insulina e alterações no microambiente folicular e uterino. Em relação à fisiologia reprodutiva específica de vacas leiteiras de alta produção, nossa principal hipótese é que as dietas ricas em energia se mostram benéficas para a qualidade do ovócito no período pós-parto imediato, provavelmente através da atenuação da intensidade e da duração do BEN (Kendrick et al. 1999; Gwazdauskas et al. 2000). Em uma fase pós-parto mais tardia, entretanto, quando as vacas leiteiras já voltaram a um estado de balanço energético positivo, o alto consumo (excesso) de energia pode resultar na produção de ovócitos superestimulados e de qualidade inferior (Armstrong et al. 2001), que resultam em embriões de qualidade pior. O resultado final é redução nas taxas de concepção e maior incidência de mortalidade embrionária. Ainda assim as dietas que comprovadamente estimulam o crescimento folicular podem não necessariamente ser benéficas para a qualidade do ovo!

## **SUPLEMENTAÇÃO DE GORDURAS NA DIETA E EFEITO SOBRE A QUALIDADE DO OVÓCITO E DO EMBRIÃO**

As dietas modernas de lactação são geralmente suplementadas com gordura protegida da ação ruminal para promover maior consumo de energia no período pós-parto imediato e estimular a fertilidade (Beam e Butler 1997; Thatcher et al. 2006). Existem diversas hipóteses que procuram explicar como a gordura da dieta poderia influenciar o desempenho reprodutivo (revisão de Staples et al. 1998; Fig. 2), mas é importante ressaltar que os resultados relatados quanto aos efeitos sobre a fertilidade são contraditórios (Staples et al. 1998; McNamara et al. 2003; Van Knegsel et al. 2005). Na tentativa de melhorar o balanço de energia (DeFraín et al. 2005), a suplementação de gordura eleva o teor de gordura na dieta e estimula a produção de leite e, portanto, a perda de energia, resultando em níveis ainda mais elevados de AGNES e ácido beta-hidroxibutírico ( $\beta$ -OHB) e concentrações ainda menores de glicose e insulina (McNamara et al. 2003; Van Knegsel et al. 2005; Moallem et al. 2007). Em um estudo muito recente com dietas isocalóricas, Van Knegsel et al. (2007b) observaram que dietas lipogênicas resultaram em maior direcionamento de energia para o leite. A suplementação de gordura aumenta o diâmetro e a produção de estradiol do folículo pré-ovulatório (Lucy et al. 1991; Beam e Butler 1997; Moallem et al. 2007), provavelmente através da indução de altas concentrações de colesterol no fluido folicular e no plasma. O maior diâmetro do folículo pode ter efeitos benéficos tanto sobre a qualidade do ovócito quanto sobre a função do CL, como já foi discutido anteriormente (Vasconcelos et al. 2001). A hipercolesterolemia resultante também promove maior secreção de progesterona suportando, portanto, o desenvolvimento de competência pelo embrião (Ryan et al. 1992; Lammoglia et al. 1996; McNamara et al. 2003). Além das dietas suplementadas unicamente com ácidos graxos saturados ou mono-insaturados (para elevar o consumo de

energia), os ácidos graxos poli-insaturados também estão se tornando populares; especialmente para a elevação das concentrações de ácidos graxos ômega-3 (n-3) no leite. A suplementação com estes ácidos graxos poli-insaturados pode reduzir a secreção de prostaglandinas pelo endométrio, prolongando a vida do CL (Staples et al. 1998; Cheng et al. 2001; Thatcher et al. 2006), um efeito que seria benéfico para a sobrevivência do embrião. Recentemente, Bilby et al. (2006) descreveram o mecanismo que explica esta observação, demonstrando que dietas ricas em óleo de peixe (n-3 poli-insaturados) tem o potencial de reduzir a expressão de ciclo-oxigenase-2 endometrial, uma enzima essencial para a biossíntese de prostaglandinas (Bilby et al. 2006; Thatcher et al. 2006). Hinckley et al. (1996), por outro lado, demonstraram que o óleo de peixe também é capaz de inibir a produção de progesterona por células de corpo lúteo cultivadas *in vitro*. Esta observação foi confirmada *in vivo* por um estudo em que as vacas foram alimentadas com uma dieta rica em sementes de linhaça (ácido linolênico, C18:3, n-3), levando a redução das concentrações plasmáticas de progesterona (Robinson et al. 2002). Mattos et al. (2002) não conseguiram corroborar este efeito negativo sobre a produção de progesterona em vacas sincronizadas alimentadas com ácido eicosapentaenóico (EPA; C20:5, n-3) ou ácido docosahexaenóico (DHA; C22:6, n-3). Em outras palavras, é importante considerar o tipo exato de gordura a ser suplementada (comprimento da cadeia de carbonos e grau de saturação) quanto se estima seu efeito sobre a fertilidade. Claramente, resultados conclusivos quanto aos efeitos da suplementação de dietas leiteiras com gorduras sobre o desempenho reprodutivo somente serão obtidos em estudos complementares (Figura 2).



**Figura 2.** Representação diagramática dos principais mecanismos através dos quais dietas ricas em gordura podem afetar a qualidade do ovócito e do embrião em vacas leiteiras de alta produção. As dietas suplementadas com gordura não tem efeito positivo sobre o balanço de energia. Entretanto, promovem crescimento folicular e a secreção de esteróides (devido à maior disponibilidade do substrato colesterol). Os ácidos graxos poli-insaturados tem efeito positivo sobre a qualidade do ovócito e podem dar suporte à sobrevida embrionária inicial através da redução da secreção de prostaglandina F2 $\alpha$  pelo endométrio. Ácidos graxos saturados podem ter efeito contrário. AGPI: ácidos graxos poli-insaturados; AGS: ácidos graxos saturados ou mono-insaturados; PGF2 $\alpha$ : prostaglandina F2 $\alpha$ .



Se aceita de maneira geral que a qualidade do ovócito e do embrião está intimamente relacionada à sua composição de ácidos graxos, especialmente da fração de fosfolípides (McEvoy et al. 2000). A avaliação dos possíveis efeitos diretos de dietas ricas em gorduras sobre a qualidade do ovócito e do embrião, permitiu que se demonstrasse recentemente que a adição de 6% de gordura protegida (saturada e mono -insaturada) pode alterar o perfil de ácidos graxos, tanto no soro quanto no fluido folicular (FF) (Adamiak et al. 2004). Ainda não se sabe se estas alterações se refletem também no microambiente tubário e/ou uterino. Além disso, a mudança na composição de ácidos graxos do FF também se reflete no teor de ácidos graxos e no perfil do complexo cópula-ovócito (Adamiak et al. 2005b; Rooke et al. 2006). A composição de ácidos graxos e, portanto, a fluidez da membrana do ovócito ou embrião pode ser afetada pelo microambiente (Zeron et al. 2001). Acredita-se que os triglicérides, armazenados em gotículas lipídicas, sejam uma importante reserva de energia (Kim et al. 2001). Durante a pré-maturação e maturação *in vivo*, parece ocorrer acúmulo fisiológico de lipídeos no ovócito (Fair 2003). Sata et al. (1999) e Kim et al. (2001) demonstraram *in vitro* que ovócitos e embriões são capazes de acumular ácidos graxos a partir do meio de cultura. Caso o acúmulo seja excessivo, entretanto, afeta a qualidade dos embriões através do aumento de sua sensibilidade ao estresse oxidativo, resfriamento e crio-preservação (Abe et al. 1999; Reis et al. 2003). Além disso, maior acúmulo de lipídeos já foi associado a função mitocondrial subótima e ao desvio na abundância relativa de transcritos de genes importantes para o desenvolvimento e de genes de resposta ao estresse, afetando negativamente a qualidade e a viabilidade do embrião (Abe et al. 2002; Rizos et al. 2003; Fig. 2). Como já foi mencionado anteriormente, recentemente descrevemos concentrações extremamente altas de lipídeos em embriões coletados de vacas leiteiras de alta produção, se comparados ao teor de lipídeos de embriões de novilhas leiteiras ou vacas de corte (Leroy et al. 2005a). O alto teor de lipídeos conferiu uma coloração escura aos embriões e uma aparência semelhante à de embriões produzidos *in vitro* quando cultivados na presença de soro (Leroy et al. 2005a). Ainda não se sabe o motivo deste efeito e este interessante achado está atualmente sendo investigado. A hipótese é que adaptações fisiológicas para o suporte de altos níveis de produção de leite resultem em alteração do microambiente do ovócito e/ou embrião, afetando o metabolismo lipídico e/ou levando a uma captação excessiva de lipídeos.

As consequências do fornecimento de dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados sobre a qualidade subsequente do ovócito ou embrião não foram estudadas em detalhe. Bilby et al. (2006) observaram efeito negativo sobre a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos quando vacas leiteiras foram suplementadas com ácido linoleico (C18:2, n-6). Estudos em ovelhas, por outro lado, indicaram um efeito favorável sobre a qualidade do ovócito com a suplementação da dieta com óleo de peixe protegido da ação ruminal (Zeron et al., 2002). Além disso, Zeron et al. (2002) demonstraram alterações na composição de ácidos graxos do ovócito, resultando em um efeito positivo sobre a integridade de sua membrana após resfriamento. Somente recentemente, Pereira et al. (2007) conseguiram reduzir o acúmulo de lipídeos durante o cultivo *in vitro* e melhoraram a sobrevivência de blastocistos bovinos crio-preservados através da suplementação do meio de cultura contendo soro com ácido linoleico conjugado (C18:2, trans-10 cis-12). Estudos complementares são certamente necessários.

## **ALTA PRODUÇÃO DE LEITE VIA INGESTÃO DE TEORES ELEVADOS DE PROTEÍNA BRUTA NA DIETA E POSSÍVEIS CONSEQUÊNCIAS SOBRE QUALIDADE DE OVÓCITO E EMBRIÃO**

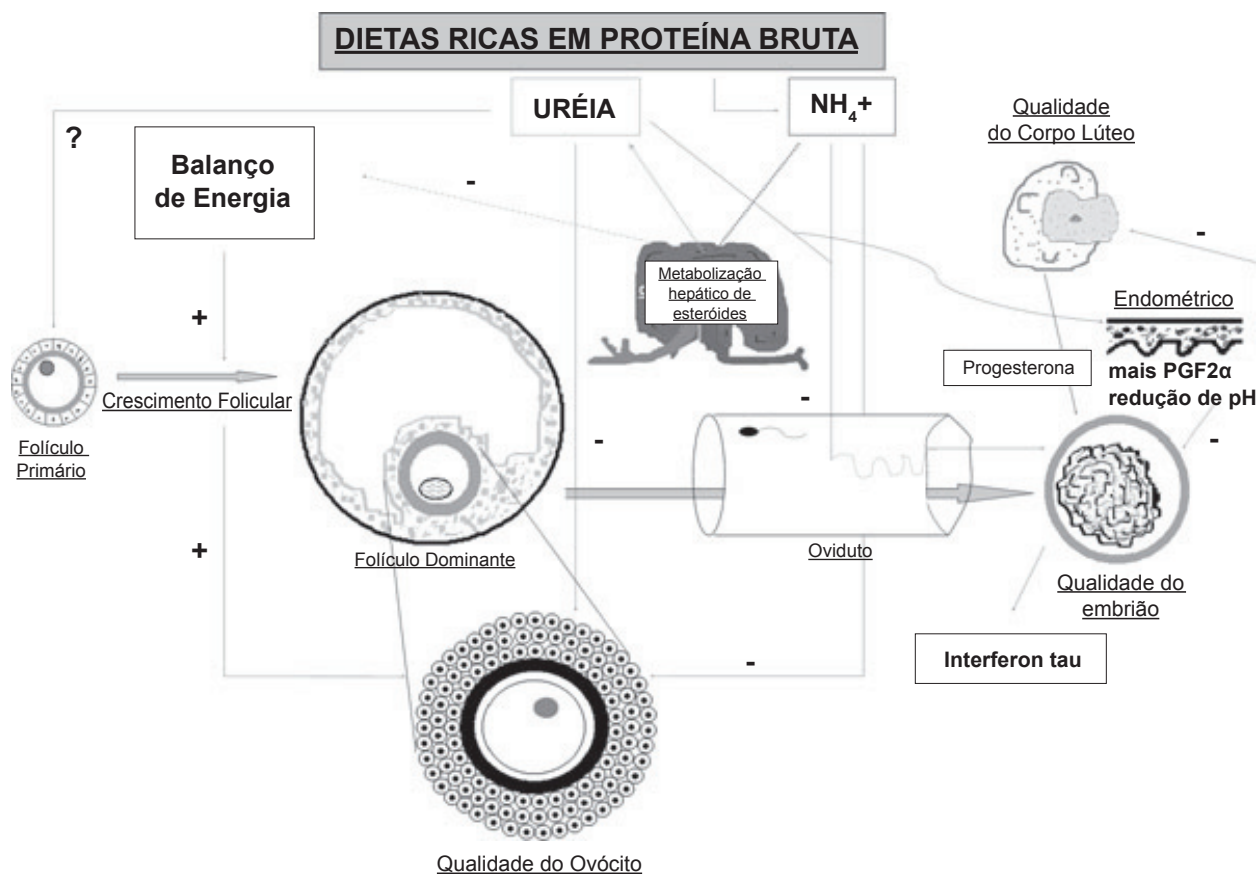
Uma das estratégias para sustentar altos níveis de produção de leite em fase inicial de lactação é elevar os níveis de proteína bruta da dieta (até 19% ou mais em base matéria seca; Butler 1998). Muita atenção tem sido dada à fração de proteína rapidamente degradável por bactérias e protozoários ruminais. A ingestão

excessiva de proteína degradável e uma escassez relativa de energia (carboidratos) para a síntese de proteína bacteriana resulta em acúmulo excessivo de amônia no rúmen (Sinclair et al. 2000a), que é absorvida através da parede ruminal e é convertida em uréia no fígado. Este processo de detoxificação consome energia e pode exacerbar o BEN no pós-parto imediato, reduzindo assim a fertilidade (Butler 1998; Fig. 3). Uma segunda fonte de uréia produzida no fígado é a deaminação e o catabolismo de aminoácidos.

Apesar dos efeitos de estímulo da produção de leite, altos níveis de proteína na dieta foram associados a piora de desempenho reprodutivo na maioria, mas não em todos os estudos (revisão de Butler 2003; Melendez et al. 2003). Além disso, a possibilidade de confundimento entre consumo de proteína e BEN induzido pela lactação sobre o desempenho reprodutivo pode dificultar a interpretação de alguns resultados dos estudos (Butler 1998; Gath et al. 1999; Kenny et al. 2001, 2002). Altos níveis de proteína bruta na dieta não parecem ter impacto negativo sobre a retomada da ciclicidade ovariana na vaca leiteira pós-parto. Entretanto, taxas de concepção reduzidas (até 30% e 20% de redução em vacas e novilhas leiteiras, respectivamente) em animais com concentrações séricas de uréia superiores a 20 mg/dl (ou concentrações de uréia no leite >19 mg/dl) são frequentemente relatadas (Butler et al. 1996; Westwood et al. 1998; Sinclair et al. 2000b; Melendez et al. 2003). A principal patogenia sugerida para estas falhas de concepção (ou mortalidade embrionária precoce) é a potencial toxicidade direta dos subprodutos do catabolismo de proteínas (amônia e uréia) para o ovócito e embrião (Figura 3). Por exemplo, embriões de ratos cultivados na presença de altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  apresentaram anomalias morfológicas, metabólicas e genéticas (Gardner e Lane 1993; Lane e Gardner 2003). Entretanto, sabe-se que a vaca leiteira em lactação pode apresentar uma adaptação metabólica a períodos prolongados de alto consumo de proteína degradável e compensar os possíveis efeitos adversos das altas concentrações de uréia sobre o crescimento do embrião (Dawuda et al. 2002; Laven et al. 2004). Esta adaptação, entretanto, não pode ser confirmada em ovelhas (McEvoy et al. 1997a,b). Em um estudo conduzido na Finlândia, um aumento moderado de longo prazo no teor de proteína bruta na dieta de 14% para 18% acabou se mostrando benéfico para a qualidade de embriões de novilhas Ayrshire, apesar da elevação concomitante nos níveis de uréia no sangue (Mikkola et al. 2005).

Altas concentrações sistêmicas de uréia foram associadas a redução no pH uterino (7,1 para 6,8) e a alterações na composição iônica do fluido uterino, contribuindo para criar um ambiente hostil para o embrião em desenvolvimento (Jordan et al. 1983; Elrod e Butler 1993). Estas observações foram recentemente confirmadas *in vitro* por Ocon e Hansen (2003). Além disso, culturas de células endometriais incubadas com uréia secretaram níveis significativamente mais elevados de  $\text{PGF}_2\alpha$  em comparação a culturas-controle (Butler 1998). Finalmente, já foi sugerido que tal ambiente uterino também é hostil para a viabilidade e motilidade dos espermatozoides (Westwood et al. 1998). Fahey et al. (2001) observaram piora da qualidade de embriões em ovelhas doadoras alimentadas com dietas ricas em proteína, mas não houve efeito da dieta das receptoras sobre a sobrevivência dos embriões transferidos. Os autores sugerem que o efeito adverso da uréia sobre a qualidade do embrião se deva a alterações no ambiente do folículo e/ou oviduto e não a alterações do ambiente uterino (Fahey et al. 2001; Papadopoulos et al. 2001). Estas observações foram recentemente confirmadas em estudo com vacas leiteiras em lactação (Rhoads et al. 2006). A transferência de embriões, coletados de vacas leiteiras com concentrações plasmáticas elevadas de uréia (24 mg/dl) por várias semanas, resultou em redução significativa das taxas de prenhez. É importante mencionar que houve redução das taxas de prenhez, independentemente dos níveis de uréia das receptoras (Rhoads et al. 2006). Os ovócitos recuperados de novilhas de corte que haviam apresentado elevação dos níveis séricos de amônia, tanto no soro quanto no FF, demonstraram comprometimento da aquisição de competência *in vitro* (Sinclair et al. 2000b). Hammon et al. (2000a) demonstraram que os efeitos da amônia sobre ovócitos bovinos *in vitro* dependem do momento e da duração da exposição (Hammon et al. 2000b). Além disso, uma vez que a amônia é também tóxica para as células da granulosa *in vitro*, elas perdem a capacidade de dar suporte à maturação do ovócito *in vitro* (Rooke et al. 2004). Leroy et al. (2004) e também Hammon et al. (2005) observaram alta

correlação entre as concentrações plasmáticas de uréia e no fluido folicular ou uterino em vacas leiteiras de alta produção no período pós-parto imediato. De Wit et al. (2001) relataram retardo na maturação nuclear e redução das taxas de fertilização e clivagem em ovócitos bovinos maturados na presença de 6 mM de uréia, provavelmente através da inibição da polimerização da tubulina em micro-túbulos (De Wit et al. 2001). Efeitos tóxicos similares sobre a maturação do ovócito foram documentados por Ocon e Hansen (2003).



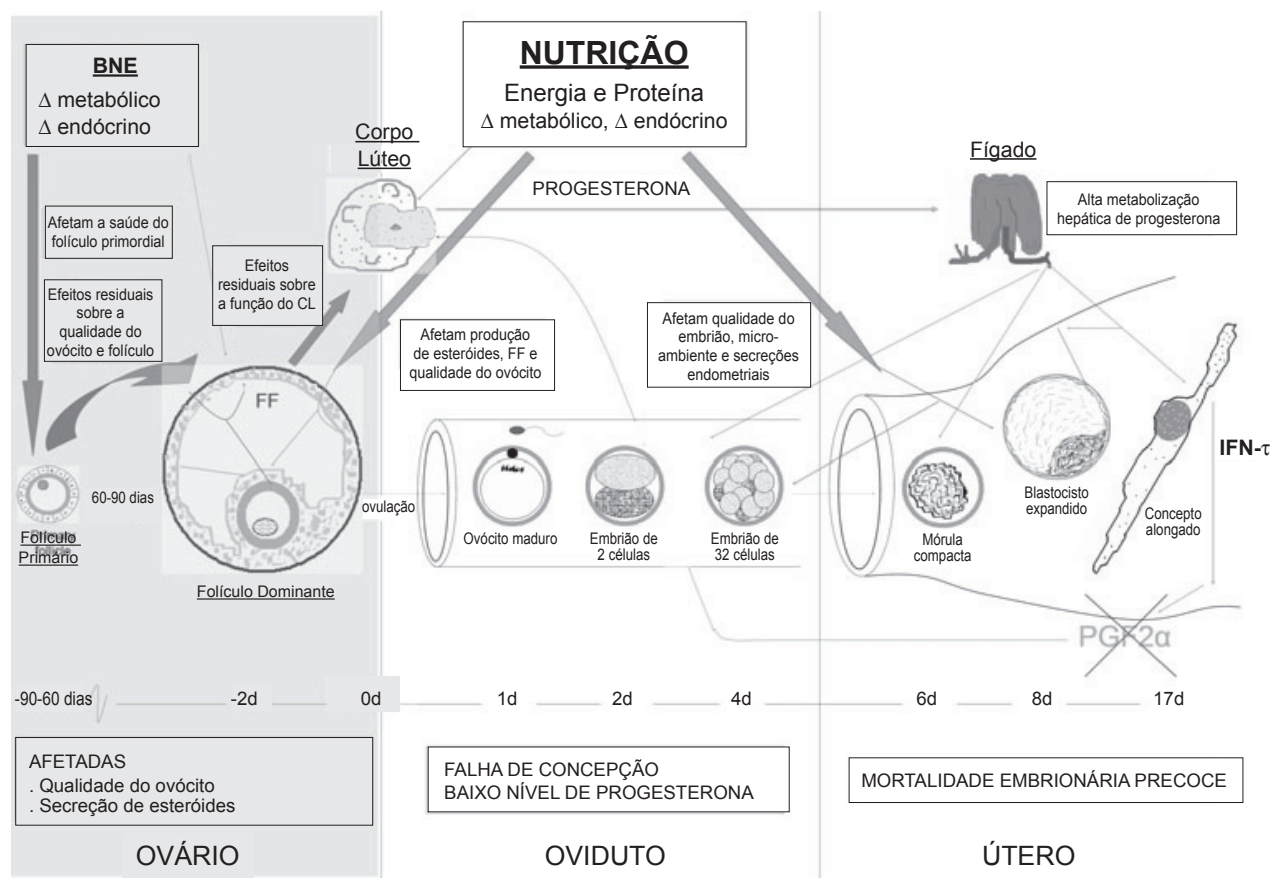
**Figura 3.** Representação diagramática dos principais mecanismos através dos quais dietas com alto teor de proteína bruta podem afetar a qualidade do ovócito e do embrião em vacas leiteiras de alta produção. Dietas ricas em proteína bruta podem resultar em níveis séricos elevados de amônia e uréia, que se refletem no fluido folicular e podem afetar negativamente o ovócito. Além disso, a alteração do ambiente no oviduto e útero tem efeito tóxico direto sobre o embrião. O processo de deaminação e síntese de uréia no fígado necessita de energia e pode exacerbar o balanço negativo de energia. Em conclusão, pode-se afirmar que, apesar da grande variação nos desenhos experimentais e de resultados contraditórios observados em alguns casos, existe um corpo bastante robusto de evidências que permite supor que dietas que resultam em níveis séricos excessivamente elevados de uréia e amônia podem afetar negativamente a qualidade do ovócito e do embrião. Este efeito adverso pode ocorrer tanto no embrião (especialmente através da amônia) quanto no ovócito (particularmente através da uréia). A duração da exposição a tais dietas ricas em proteína é, entretanto, também importante, pois as vacas são capazes de compensar os efeitos negativos quando tais dietas são fornecidas ao longo de várias semanas.

## OUTROS POSSÍVEIS FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE DE OVÓCITO E EMBRIÃO EM VACAS LEITEIRAS MODERNAS

Durante décadas, as vacas leiteiras foram selecionadas para alto rendimento leiteiro. Alguns estudos sugerem que esta seleção genética em si poderia ter tido um efeito adverso sobre a qualidade do ovócito



(Figura 4). Snijders et al. (2000) coletaram ovócitos de vacas de alto e baixo mérito genético e observaram uma capacidade significativamente menor de desenvolvimento in vitro nos ovócitos produzidos por vacas de alto mérito, independentemente da produção de leite. Além disso, um maior número de vacas de alto mérito não havia emprenhado ao final da estação de cobertura. Surpreendentemente, não se detectaram diferenças evidentes nas concentrações de AGNEs nestes dois grupos, indicando que não havia diferenças significativas no balanço de energia (Snijders et al. 2001). Além disso, no estudo de prenhez, não se observaram diferenças no desenvolvimento folicular pós-parto, sugerindo que a própria qualidade do ovócito pode estar reduzida nas vacas de alto mérito genético. Ao contrário das observações de Snijders et al. (2001), Veerkamp et al. (2003) e Horan et al. (2005) sugeriram que o alto mérito genético para produção de leite também poderia estar associado a um BEN mais intenso. Este maior nível de estresse metabólico poderia explicar a pior qualidade do ovócito e o desempenho reprodutivo insatisfatório. Silke et al. (2002) não detectaram nenhuma associação significativa entre a incidência ou o padrão de perda embrionária tardia e mérito genético para produção de leite. Possíveis influências de seleção genética são, portanto, provavelmente expressas em termos de qualidade do ovócito ou fases iniciais da vida embrionária (até 2 semanas após a fertilização).



**Figura 4.** Representação diagramática dos principais mecanismos através dos quais o balanço energético negativo, a função do corpo lúteo ou a nutrição podem afetar diretamente a qualidade do ovócito e/ou embrião. A zona cinza representa os mecanismos associados ao balanço energético negativo explicados na primeira parte do trabalho complementar apresentado. Uma vez que estes mecanismos estão intimamente ligados e permitem ao leitor ter uma visão geral, todo o processo foi representado. \*Além disso, outros fatores importantes tais como alto mérito genético para produção de leite, estresse calórico ou doenças infecciosas podem afetar direta ou indiretamente a qualidade do ovócito e do embrião. Entretanto, por razões de clareza não foram incluídas as interações destes fatores com os mecanismos descritos. BEN: balanço energético negativo; Δ: 'alterações'; IFN-T: interferon-tau; PGF2α: prostaglandina F2α.

Além da seleção genética para maior produção de leite, as vacas leiteiras modernas se tornaram mais suscetíveis ao estresse calórico, uma vez sua taxa metabólica e, conseqüentemente, sua produção de calor aumentaram consideravelmente (revisão de Kadzere et al. 2002). Sabe-se que o estresse calórico afeta negativamente a reprodução (revisão de De Rensis e Scaramuzzi 2003). Além dos efeitos adversos sobre o balanço de energia, dinâmica folicular e eixo hipotalâmico–pituitário–ovariano, já foi sugerido que altas temperaturas corporais podem exercer efeito tóxico direto sobre o ovócito e embrião em fase de préimplantação (Edwards e Hansen 1997; Rocha et al. 1998; Hansen 2007). Estresse calórico ocorrido 20–50 dias antes da inseminação artificial (IA) pode resultar em redução dramática das taxas de concepção (Chebel et al., 2004), indicando que existe um efeito de longo prazo da temperatura sobre a qualidade do ovócito a ser ovulado várias semanas depois. O estresse calórico também pode induzir a degeneração das células da granulosa e da teca, comprometendo assim a esteroidogênese (Chebel et al. 2004). Hansen (2007) publicou uma excelente discussão sobre os efeitos do estresse calórico sobre a qualidade do embrião.

Se aceita de forma geral que vacas leiteiras de alta produção são mais vulneráveis a distúrbios metabólicos e doenças infecciosas. As doenças do pós parto constituem um importante fator de risco para a falha reprodutiva, juntamente com o período de BEN (Loeffler et al. 1999). Tanto a incidência quanto a gravidade da mastite clínica são significativamente elevadas em vacas leiteiras modernas, provavelmente devido à imunodepressão no pós parto imediato (Ingvarsen et al. 2003; Burvenich et al. 2003). Mastite no período pós parto imediato e infecções intra-mamárias por ocasião da IA apresentam correlação positiva com redução nas taxas de concepção (Loeffler et al. 1999) e mais especificamente com risco mais elevado de abortamento durante o primeiro trimestre de gestação (Risco et al. 1999). Os possíveis mecanismos envolvidos na correlação entre doenças infecciosas e mortalidade embrionária foram exaustivamente discutidos por Hansen et al. (2004) e estão além do escopo da presente revisão. A Figura 4 apresenta um resumo de todos os mecanismos discutidos no presente trabalho.

## CONCLUSÕES

A maximização da produção de leite individual das vacas é uma prioridade do ponto de vista econômico e ambiental. Entretanto, a fertilidade das vacas leiteiras modernas tem apresentado constante declínio e algumas pessoas já se perguntam se não teríamos atingido o limite do que é fisiologicamente possível. Atualmente, existe um número crescente de evidências científicas que sugerem que a piora da qualidade de ovócitos e embriões é o principal fator na complexa patogenia das falhas reprodutivas. O ovócito e o embrião são vulneráveis a uma série de distúrbios endócrinos e metabólicos, que afetam seu microambiente. Somente recentemente passaram a ser conduzidos vários estudos na tentativa de expandir o volume de conhecimentos sobre a composição específica do microambiente no folículo, oviduto e útero.

Este trabalho apresentou uma revisão dos diversos mecanismos propostos que podem afetar a qualidade do ovócito e/ou embrião em vacas leiteiras modernas em uma fase posterior ao período de balanço energético negativo (BEN). A típica dieta de estímulo da produção de leite pode estar associada a alterações endócrinas e metabólicas significativas, que provavelmente podem prejudicar direta ou indiretamente a qualidade do gameta feminino ou do embrião. As recomendações nutricionais para a otimização do crescimento folicular parecem ser diferentes das que promovem melhor qualidade do ovócito. Desta forma, são necessárias formulações altamente complexas e fica difícil traduzi-las em recomendações a serem aplicadas na prática pelo produtor de leite. Além das questões nutricionais, existe a influência de fatores genéticos, doenças infecciosas e do estresse calórico, que comprovadamente podem comprometer a qualidade do ovócito e do embrião. É óbvio que existe a necessidade de pesquisas complementares para elucidar estes vários aspectos e responder às inúmeras questões levantadas.

## REFERÊNCIAS

- Abe H, Yamashita S, Itoh T, Satoh T, Hoshi H, 1999: Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Mol Reprod Dev* 53, 325–335.
- Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H, 2002: Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 61, 57–66.
- Abecia JA, Lozano JM, Forcada F, Zarazaga L, 1997: Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Anim Reprod Sci* 48, 209–218.
- Adamiak SJ, Mackie K, Ewen M, Powell KA, Watt RG, Rooke JA, Webb R, Sinclair KD, 2004: Dietary carbohydrates and lipids affect in vitro embryo production following OPU in heifers. *Reprod Fertil Dev* 16, 193–194 (abstract).
- Adamiak SJ, Mackie K, Watt RG, Webb R, Sinclair KD, 2005a: Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol Reprod* 73, 918–926.
- Adamiak S, Ewen M, Rooke J, Webb R, Sinclair K 2005b: Diet and fatty acid composition of bovine plasma, granulosa cells, and cumulus-oocyte complexes. *Reprod Fertil Dev* 17, 200–201 (abstract).
- Armstrong DG, McEvoy TG, Baxter G, Robinson JJ, Hogg CO, Woad KJ, Webb R, Sinclair KD, 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. *Biol Reprod* 64, 1624–1632.
- Armstrong DG, Baxter G, Hogg CO, Woad KJ, 2002a: Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reproduction* 123, 789–797.
- Armstrong DG, Gong JG, Webb R, 2002b: Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reproduction (Suppl. )* 61, 403–414.
- Armstrong DG, Gong JG, Gardner JO, Baxter G, Hogg CO, Webb R, 2002c: Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction* 123, 371–378.
- Beam SW, Butler WR, 1997: Energy balance and ovarian follicle development prior to first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol Reprod* 56, 133–142.
- Bilby TR, Guzeloglu A, MacLaren LA, Staples CR, Thatcher WW, 2006: Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: II. Endometrial gene expression related to maintenance of pregnancy. *J Dairy Sci* 89, 3360–3375.
- Boland MP, Lonergan P, O’Callaghan D, 2001: Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 55, 1323–1340.
- Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L, 2003: Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 34, 521–564.
- Butler WR, 1998: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci* 81, 2533–2539.
- Butler WR, 2003: Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in pp dairy cows. *Livest Prod Sci* 83, 211–218.

- Butler WR, Calaman JJ, Beam SW, 1996: Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J Anim Sci* 74, 858–865.
- Chebel RC, Santos JEP, Reynolds JP, Cerri RLA, Juchem SO, Overton M, 2004: Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 84, 239–255.
- Cheng Z, Robinson RS, Pushpakumara PGA, Mansbridge RJ, 2001: Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on uterine prostaglandin synthesis in the cow. *J Endocrin* 171, 463–473.
- Comin A, Gerin D, Cappa A, Marchi V, Renaville R, Motta M, Fazzini U, Prandi A, 2002: The effect of an acute energy deficit on the hormone profile of dominant follicles in dairy cows. *Theriogenology* 58, 899–910.
- Dawuda PM, Scaramuzzi RJ, Leese HJ, Hall CJ, Peters AR, Drew SB, Wathes DC, 2002: Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows. *Theriogenology* 58, 1443–1455.
- De Rensis F, Scaramuzzi RJ, 2003: Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow – a review. *Theriogenology* 60, 1139–1151.
- De Wit AAC, Cesar MLF, Kruip TAM, 2001: Effect of urea during in vitro maturation on nuclear maturation and embryo development of bovine cumulus-oocyte-complexes. *J Dairy Sci* 84, 1800–1804.
- DeFrain JM, Hippen AR, Kalscheur KF, Patton RS, 2005: Effects of feeding propionate and calcium salts of long-chain fatty acids on transition dairy cow performance. *J Dairy Sci* 88, 983–993.
- Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM, 2003: Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci* 78, 345–370.
- Dunne LD, Diskin MG, Boland MP, O’Farrell KJ, Sreenan JM, 1999: The effect of pre- and post-insemination plane of nutrition on embryo survival in beef heifers. *Anim Sci* 69, 411–417.
- Edwards JL, Hansen PJ, 1997: Differential responses of bovine oocyte and preimplantation embryos to heat shock. *Mol Reprod Dev* 46, 138–145.
- Elrod CC, Butler WR, 1993: Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J Anim Sci* 71, 694–701.
- Fahey J, Boland MP, O’Callaghan D, 2001: The effects of dietary urea on embryo development in superovulated donor ewes and on early embryo survival and development in recipient ewes. *Anim Sci* 72, 395–400.
- Fair T, 2003: Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 78, 203–216.
- Gardner DK, Lane M, 1993: Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod* 48, 377–385.
- Gath V, Lonergan P, Boland MP, O’Callaghan D, 1999: Effects of diet type on establishment of pregnancy and embryo development in beef heifers. *Theriogenology* 51, 224 (abstract).
- Gong JG, 2002: Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest Anim Endocrinol* 23, 229–241.
- Gwazdauskas FC, Kendrick KW, Pryor AW, Bailey TL, 2000: Impact of follicular aspiration on folliculogenesis as influenced by dietary energy and stage of lactation. *J Dairy Sci* 83, 1625–1634.
- Hammon DS, Wang S, Holyoak GR, 2000a: Ammonia concentration in bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on subsequent embryo development. *Anim Reprod Sci* 58, 1–8.



- Hammon DS, Wang S, Holyoak GR, 2000b: Effects of ammonia during different stages of culture on development of in vitro produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 59, 23–30.
- Hammon DS, Holyoak GR, Dhiman TR, 2005: Association between blood plasma urea nitrogen levels and reproductive fluid urea nitrogen and ammonia concentrations in early lactation dairy cows. *Anim Reprod Sci* 86, 195–204.
- Hansen PJ, 2007: To be or not to be – determinants of embryonic survival following heat shock. *Theriogenology*, doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.03.013.
- Hansen PJ, Soto P, Natzke RP, 2004: Mastitis and fertility in cattle – possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am J Reprod Immun* 51, 294–301.
- Hinckley T, Clark RM, Bushmich SL, Milvae RA, 1996: Long chain polyunsaturated fatty acids and bovine luteal cell function. *Biol Reprod* 55, 445–449.
- Horan B, Mee JF, O’connor P, Rath M, Dillon P, 2005: The effect of strain of Holstein-Friesian cow and feeding system on postpartum ovarian function, animal production and conception rate to first service. *Theriogenology* 63, 950–971.
- Ingvartsen KL, Dewhurst RJ, Friggens NC, 2003: On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production disease in dairy cattle? A position paper. *Livest Prod Sci* 82, 277–308.
- Jordan ER, Chapman TE, Holtan DW, Swanson LV, 1983: Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood in high-producing postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 66, 1854–1862.
- Kadzere CT, Murphy MR, Silanikove N, Maltz E, 2002: Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livest Prod Sci* 77, 59–91.
- Kendrick KW, Bailey TL, Garst AS, Pryor AW, Ahmadzadeh A, Akers RM, Eyestone WE, Pearson RE, Gwazdauskas FC, 1999: Effects of energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. *J Dairy Sci* 82, 1731–1740.
- Kenny DA, Boland MP, Diskin MG, Sreenan JM, 2001: Effect of pasture crude protein and fermentable energy supplementation on blood metabolite and progesterone concentrations and on embryo survival in heifers. *Anim Sci* 73, 501–511.
- Kenny DA, Boland MP, Diskin MG, Sreenan JM, 2002: Effect of rumen degradable protein with or without fermentable carbohydrate supplementation on blood metabolites and embryo survival. *Anim Sci* 74, 529–537.
- Kim JY, 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.
- Lammoglia MA, Willard ST, Oldham JR, Randel RD, 1996: Effects of dietary fat and season on steroid hormonal profiles before parturition and on hormonal, cholesterol, triglycerides, follicular patterns, and postpartum reproduction in Brahman cows. *J Anim Sci* 74, 2253–2262.
- Landau S, Braw-Tal R, Kaim M, Bor A, Bruckental I, 2000: Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows. *Anim Reprod Sci* 64, 181–197.
- Lane M, Gardner DK, 2003: Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod* 69, 1109–1117.

- Laven RA, Dawuda PM, Scaramuzzi RJ, Wathes DC, Biggadike HJ, Peters AR, 2004: The effect of feeding diets high in quickly degradable nitrogen on follicular development and embryo growth in lactating Holstein dairy cows. *Anim Reprod Sci* 84, 41–52.
- Leroy JLMR, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts IGF, Bols PEJ, 2008: Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? part i: the importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in highyielding dairy cows. *Reprod Dom Anim*, doi: 10.1111/j.1439- 0531.2007.00960.x.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, de Kruif A, 2004: Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 80, 201–211.
- Leroy JLMR, Opsomer G, De Vlieghe S, Vanholder T, Goossens L, Geldhof A, Bols PEJ, de Kruif A, Van Soom A, 2005a: Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology* 64, 2022–2036.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, de Kruif A, Genicot G, Van Soom A, 2005b: Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 130, 485–495.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Opsomer G, Van Soom A, de Kruif A, 2006: The in vitro development of bovine oocytes after maturation in glucose and beta-hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows. *Reprod Domest Anim* 41, 119–123.
- Loeffler SH, de Vries MJ, Schukken YH, 1999: The effects of timing of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows. *J Dairy Sci* 82, 2589–2604.
- Lozano JM, Lonergan P, Boland MP, O’Callaghan D, 2003: Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and postfertilization development. *Reproduction* 125, 543–553.
- Lucy MC, Staples CR, Michel FM, Thatcher WW, 1991: Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 74, 473–482.
- Mattos R, Staples CR, Williams J, Amorcho A, McGuire MA, Thatcher WW, 2002: Uterine, ovarian and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of Menhaden fish meal. *J Dairy Sci* 85, 755–764.
- McEvoy TG, Robinson JJ, Aitken RP, Findlay PA, Palmer RM, Robertson IS, 1995: Dietary-induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent in vivo and in vitro development of their ova. *Anim Reprod Sci* 39, 89–107.
- McEvoy TG, Sinclair KD, Staines ME, Robinson JJ, Armstrong DG, Webb R, 1997a: In vitro blastocyst production in relation to energy and protein intake prior to collection. *J Reprod Fertil Abstr Series* 19 (abstract 132).
- McEvoy TG, Robinson JJ, Aitken RP, Findlay PA, Robertson IS, 1997b: Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. *Anim Reprod Sci* 47, 71–90.
- McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK, 2000: Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil* 118, 163–170.
- McEvoy TG, Robinson JJ, Ashworth CJ, Rooke JA, Sinclair KD, 2001: Feed and forage toxicants affecting embryo survival and fetal development. *Theriogenology* 55, 113–129.

- McNamara S, Butler T, Ryan DP, Mee JF, Dillon P, O'Mara FP, Butler ST, Anglesey D, Rath M, Murphy JJ, 2003: Effect of offering rumen-protected fat supplements on fertility and performance in spring-calving Holstein-Friesian cows. *Anim Reprod Sci* 79, 45–56.
- Melendez P, Donovan A, Hernandez J, Bartolome J, Risco CA, Staples C, Thatcher WW, 2003: Milk, plasma, and blood urea nitrogen concentrations, dietary protein, and fertility in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 223, 628–634.
- Mikkola M, Ma'ntysaari P, Tammiranta N, Peippo J, Taponen J, 2005: Effect of dietary protein on embryo recovery rate and quality in superovulated heifers. *Anim Reprod Sci* 87, 193–202.
- Moallem U, Katz M, Lehrer H, Livshitz L, Yakoby S, 2007: Role of peripartum dietary propylene glycol or protected fats on metabolism and early postpartum ovarian follicles. *J Dairy Sci* 90, 1243–1254.
- Nolan R, Duffy P, Wade M, O'Callaghan D, Boland MP, 1998: Effect of quantity and type of diet and frequency of trans-vaginal ovum aspiration on in-vitro embryo development in heifers. *Theriogenology* 49, 402 (abstract).
- O'Callaghan D, Boland MP, 1999: Nutritional effects on ovulation. *Anim Sci* 68, 299–314.
- O'Callaghan D, Yaakub H, Hyttel P, Spicer LJ, Boland MP, 2000: Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J Reprod Fertil* 118, 303–313.
- Ocon OM, Hansen PJ, 2003: Disruption of bovine oocytes and preimplantation embryos by urea and acidic pH. *J Dairy Sci* 86, 1194–2000.
- Papadopoulos S, Lonergan P, Gath V, Quinn KM, Evans AC, O'Callaghan D, Boland MP, 2001: Effect of diet quantity and urea supplementation on oocyte and embryo quality in sheep. *Theriogenology* 55, 1059–1069.
- Pereira RM, Baptista MC, Vasques MI, Horta AE, Portugal PV, Bessa RJ, Silva JC, Pereira MS, Marques CC, 2007: Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10cis-12 conjugated linoleic acid (10t, 12c CLA). *Anim Reprod Sci* 98, 293–301.
- Reis A, Rooke JA, McCallum GJ, Ewen M, Staines ME, Lomax MA, McEvoy TG, 2003: Fatty acid content of polar and neutral lipids from bovine blastocysts produced in vitro in the presence or absence of serum. *Reprod Abstr Series* 30, 57–58 (abstract).
- Rhoads ML, Rhoads RP, Gilbert RO, Toole R, Butler WR, 2006: Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 91, 1–10.
- Risco CA, Donovan GA, Hernandez J, 1999: Clinical mastitis associated with abortion in dairy cows. *J Dairy Sci* 82, 1684–1689.
- Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P, 2003: Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod* 68, 236–243.
- Robinson RS, Pushpakumara PGA, Cheng Z, Peters AR, Abayasekara DRE, Wathes DC, 2002: Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction* 124, 119–131.
- Robinson JJ, Ashworth CJ, Rooke JA, Mitchell LM, McEvoy TG, 2006: Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Anim Feed Sci Technol* 126, 259–276.
- Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, Godke RA, Hansel W, 1998: High environmental temperatures and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 49, 657–665.

- Rooke JA, Ewen M, Mackie K, Staines ME, McEvoy TG, Sinclair KD, 2004: Effect of ammonium chloride on the growth and metabolism of bovine ovarian granulosa cells and the development of ovine oocytes matured in the presence of bovine granulosa cells previously exposed to ammonium chloride. *Anim Reprod Sci* 84, 53–71.
- Rooke JA, Ewen M, Reis A, McEvoy TG, 2006: Comparison of the fatty acid contents of bovine follicular fluid, granulosa cells and cumulus enclosed or denuded oocytes. *Reprod Domest Anim* 41, 306 (abstract).
- Ryan DP, Spoon RA, Williams GL, 1992: Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high-fat diets and treated with follicle-stimulating hormone. *J Anim Sci* 70, 3505–3513.
- Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC, 2002: Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 85, 2803–2812.
- Sata R, Tsujii H, Abe H, Yamashita S, Hoshi H, 1999: Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum containing medium during early embryonic development. *J Reprod Dev* 45, 97–103.
- Silke V, Diskin MG, Kenny DA, Boland MP, Dillon P, Mee JF, Sreenan JM, 2002: Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 71, 1–12.
- Sinclair KD, Sinclair LA, Robinson JJ, 2000a: Nitrogen metabolism and fertility in cattle: I. Adaptive changes in intake and metabolism to diets differing in their rate of energy and nitrogen release in the rumen. *J Anim Sci* 78, 2659–2669.
- Sinclair KD, Kuran M, Gebbie FE, Webb R, McEvoy TG, 2000b: Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *J Anim Sci* 78, 2670–2680.
- Snijders SE, Dillon P, O’Callaghan D, Boland MP, 2000: Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. *Theriogenology* 53, 981–989.
- Snijders SEM, Dillon PG, O’Farrell KJ, Diskin M, Wylie ARG, O’Callaghan D, Rath M, Boland MP, 2001: Genetic merit for milk production and reproductive success in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 65, 17–31.
- Staples CR, Burke JM, Thatcher WW, 1998: Influence of supplemental fats on reproductive tissue and performance of lactating cows. *J Dairy Sci* 81, 856–871.
- Thatcher WW, Bilby TR, Bartolome JA, Silvestre F, Staples CR, Santos JEP, 2006: Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 65, 30–44.
- Van Knegsel ATM, Van de Brand H, Dijkstra J, Tamminga S, Kemp B, 2005: Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cows. *Reprod Nutr Dev* 45, 665–688.
- Van Knegsel ATM, Van den Brand H, Graat EAM, Dijkstra J, Jorritsma R, Decuypere E, Tamminga S, Kemp B, 2007a: Dietary energy source in dairy cows in early lactation: metabolites and metabolic hormones. *J Dairy Sci* 90, 1477–1485.
- Van Knegsel ATM, Van den Brand H, Dijkstra J, van Straalen WM, Heetkamp MJW, Tamminga S, Kemp B, 2007b: Dietary energy source in dairy cows in early lactation: energy partitioning and milk composition. *J Dairy Sci* 90, 1467–1476.



- Vanholder T, Leroy JLMR, Van Soom A, Opsomer G, Maes D, Coryn M, de Kruif A, 2005: Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. *Anim Reprod Sci* 87, 33–44.
- Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC, 2001: Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56, 307–314.
- Vasconcelos JLM, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC, 2003: Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology* 60, 795–807.
- Veerkamp RF, Beerda B, van der Lende T, 2003: Effects of genetic selection for milk yield on energy balance, levels of hormones, and metabolites in lactating cattle, and possible links to reduced fertility. *Livest Prod Sci* 83, 257–275.
- Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG, 2004: Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci* 83 (Suppl. E), E63–E74.
- Westwood CT, Lean IJ, Kellaway RC, 1998: Indications and implications for testing of milk urea in dairy cattle: a quantitative review: Part 2. Effect of dietary protein on reproductive performance. *N Z Vet J* 46, 123–130.
- Wiltbank MC, Sartori R, Sangsritavong S, Lopez H, Haughian JM, Fricke PM, Gumen A, 2001: Novel effects of nutrition on reproduction in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 84 (Suppl. ), 32 (abstract).
- Wrenzycki C, De Sousa P, Overstro'm EW, Duby RT, zHerrmann D, Watson AJ, Niemann H, O'Callaghan D, Boland MP, 2000: Effects of superovulated heifer diet type and quantity on relative mRNA abundances and pyruvate metabolism in recovered embryos. *J Reprod Fertil* 118, 69–78.
- Yaakub H, O'Callaghan D, Boland MP, 1999a: Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology* 51, 1259–1266.
- Yaakub H, O'Callaghan D, Boland MP, 1999b: Effect of roughage type and concentrate supplementation on follicle numbers and in vitro fertilisation on follicle numbers and in vitro fertilisation and development of oocytes recovered from beef heifers. *Anim Reprod Sci* 44, 1–12.
- Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A, 2001: Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* 121, 447–454.
- Zeron Y, Sklan D, Arav A, 2002: Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Mol Reprod Dev* 61, 271–278. Submitted: 14 Jun 2007  
Author's address (for correspondence): JLMR Leroy, Laboratory for Veterinary Physiology, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Biomedical, Pharmaceutical and Veterinary Sciences, University of Antwerp, Universiteitsplein 1, B-2610 Wilrijk, Belgium. E-mail: jo.leroy@ua.ac.be