

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

PARTE I A IMPORTÂNCIA DO BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO E DA FUNÇÃO ALTERADA DO CORPO LÚTEO PARA A PERDA DE QUALIDADE DE OVÓCITOS E EMBRIÕES EM VACAS LEITEIRAS DE ALTA PRODUÇÃO

JLMR Leroy¹, G Opsomer², A Van Soom², IGF Goovaerts¹ e PEJ Bols¹

¹Laboratory for Veterinary Physiology, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Biomedical, Pharmaceutical and Veterinary Sciences, University of Antwerp, Wilrijk; ²Department of Reproduction, Fertility and Herd Health; Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium

RESUMO

A fertilidade de vacas leiteiras de alta produção tem apresentado declínio gradativo e existem evidências que permitem supor que a qualidade de ovócitos e embriões é o principal fator na complexa patogenia da falha reprodutiva. Neste trabalho, discutimos os possíveis mecanismos que correlacionam o balanço energético negativo (BENE) às deficiências na competência de desenvolvimento de ovócitos e embriões; especificamente, na vaca leiteira de alta produção. As alterações no padrão de crescimento folicular durante o período de BEN podem afetar indiretamente a qualidade do ovócito. As alterações endócrinas e bioquímicas, associadas ao BEN se refletem no microambiente do gameta feminino que está em processo de crescimento e maturação e provavelmente resultam na ovulação de um ovócito que ainda não adquiriu competência. Mesmo depois que ocorre a ovulação e fertilização de um ovócito, ainda não há garantia de que a prenhez chegue a termo. Função inadequada do corpo lúteo, associada a níveis reduzidos de progesterona e provavelmente também a baixas concentrações de fator de crescimento semelhante à insulina, podem resultar em microambiente subótimo no útero, que se torna incapaz de sustentar a vida embrionária em fase inicial da gestação. Isto pode explicar, em parte, as baixas taxas de concepção e a alta incidência de mortalidade embrionária precoce em vacas leiteiras de alta produção.

INTRODUÇÃO

As vacas leiteiras modernas podem produzir enormes quantidades de leite, principalmente devido à combinação de melhoras significativas em termos de manejo nutricional e melhoramento genético. Um pré-requisito para bom desempenho de lactação durante a vida útil da vaca leiteira é a produção de um bezerro em intervalos regulares. Desta forma, existe uma preocupação global quanto à eficiência reprodutiva na moderna indústria leiteira, uma vez que a fertilidade afeta a produção diária de leite, número de dias em leite, número de bezerros nascidos ao ano, intervalo entre gerações e obviamente, a rentabilidade para o produtor de leite (Johnson e Gentry 2000; Royal et al. 2000; Leroy e de Kruif 2006). Muitos estudos tem relatado uma piora preocupante no desempenho reprodutivo de vacas leiteiras nas últimas décadas e este problema parece afetar todos os países que trabalham com rebanhos de alto rendimento (consultar revisão de Leroy e de Kruif 2006). Nos últimos anos, a indústria leiteira explorou a priorização de nutrientes pelo organismo da vaca para maximizar o rendimento leiteiro, criando a ‘via expressa de nutrientes’, do trato digestivo e reservas corporais diretamente para o úbere. Esta metáfora da via expressa é altamente aplicável à situação metabólica específica de vacas leiteiras de alta produção. Esta via expressa leva diretamente à glândula mamária e tem prioridade total durante as primeiras semanas pós-parto e os demais sistemas (como os que

fornece energia para o sistema reprodutivo) são desprezados ou mesmo desativados neste período inicial. Por outro lado, a energia necessária para o desenvolvimento, maturação e ovulação do folículo, para formar um corpo lúteo e para manter a fase inicial da gestação é desprezível se comparada às demandas de energia para a produção de leite e manutenção da lactação. Assim, é mais razoável supor que a ‘poluição’ causada pelos produtos de degradação deste intenso tráfego de energia do trato digestivo e reservas corporais para o úbere seja responsável pela deterioração das funções reprodutivas nas vacas de alta produção e não a falta de energia em si (Leroy et al. 2006a).

A patogenia desta síndrome de subfertilidade é complexa e as interações entre o balanço energético negativo (BEN) no pós-parto imediato e o eixo hipotalâmico-pituitário-ovariano-uterino foram especialmente bem estudadas (Ducker et al. 1985; Lucy 2001; Armstrong et al. 2002a; Butler 2003). Um dos principais fatores envolvidos nas falhas reprodutivas em vacas leiteiras são as alterações na sinalização endócrina, que levam ao atraso na retomada da ciclicidade ovariana pós-parto (Opsomer et al. 1998; Roche 2006; Vanholder et al. 2006). Entretanto, recentemente a atenção tem sido desviada para as decepcionantes taxas de concepção (Bousquet et al. 2004; Roch 2006) e à notavelmente alta incidência de mortalidade embrionária precoce (Mann e Lamming 2001; Bilodeau-Goeseels e Kastelic 2003). Desta forma, é fundamental concentrar a atenção na qualidade do ovócito e do embrião para resolver o problema da subfertilidade em vacas leiteiras de alta produção (O’Callaghan e Boland 1999). Isto nos leva a uma importante questão: será que existe o comprometimento da qualidade intrínseca do ovócito e do embrião, fator essencial para a obtenção de progênie viável, nas modernas vacas leiteiras? Snijders et al. (2000) estudaram *in vitro* o desenvolvimento da competência de ovócitos de vacas leiteiras de mérito genético alto e moderado para a produção de leite. Os ovócitos de vacas de alto mérito genético resultaram em produção significativamente menor de blastocistos *in vitro*, independentemente dos níveis de produção de leite. Isto sugere possíveis efeitos adversos da seleção genética para produção de leite sobre a fertilidade. Os resultados de estudos semelhantes sobre a qualidade de ovócitos obtidos de vacas leiteiras de alta produção estão resumidos na Tabela 1. Além da qualidade do ovócito, Wiltbank et al. (2001) demonstraram que vacas leiteiras secas produziram número significativamente maior de embriões de qualidade excelente que as vacas em lactação. Sartori et al. (2002) avaliaram a qualidade de embriões de 5 dias, 2–3 meses depois do parto e observaram que os embriões de vacas em lactação eram de qualidade muito inferior, inclusive alguns inviáveis, se comparados a embriões de vacas secas ou novilhas. Recentemente relatamos um ensaio de campo, em que a qualidade dos embriões de vacas leiteiras modernas em lactação era significativamente inferior, com embriões mais escuros e contendo até 50% mais lipídeos intracelulares se comparados aos embriões obtidos de novilhas de leite ou vacas de corte que não estivessem em lactação (Leroy et al. 2005a).

Em conclusão, pode-se afirmar que a capacidade de desenvolvimento do ovócito e a qualidade e sobrevivência do embrião estão comprometidos em vacas leiteiras modernas de alta produção (Roch 2006). Isto poderia explicar, pelo menos parcialmente, as baixas taxas de concepção e maior prevalência de mortalidade embrionária precoce observadas em vacas leiteiras em todo o mundo. Neste trabalho, procuraremos elucidar as possíveis vias na patogenia das deficiências do desenvolvimento da competência de ovócitos e embriões; mais especificamente, nas vacas leiteiras de alta produção. Em primeiro lugar, discutiremos em detalhe os efeitos do BEN durante as primeiras semanas após o parto e os efeitos das alterações endócrinas e metabólicas decorrentes sobre a qualidade do ovócito. Uma vez que o pico de BNE é superado e a lactação progride, a atividade ovariana é retomada e espera-se que logo após o cio ocorra a ovulação de um ovócito. Desta forma, o foco será o corpo lúteo e o microambiente do oviduto e útero, uma vez que são responsáveis por manter o ovócito, garantir sua fertilização e desenvolvimento para formar um embrião saudável, que deveria resultar em uma prenhez normal.

O Ovócito e o Embrião de Vacas leiteiras: Quão Vulneráveis São?

O teste mais importante (ou o padrão ouro) de qualidade do ovócito é sua capacidade de ser fertilizado, de se desenvolver até o estágio de blastocisto e finalmente estabelecer uma gestação que resultem progênie viva (Lonergan et al. 2001). Infelizmente, do ponto de vista prático, é impossível transferir todos os ovócitos identificados in vitro para receptoras e determinar se resultam em gestação. Desta forma, devem ser utilizados outros parâmetros, que estejam bem correlacionados à qualidade do ovócito. O parâmetro mais confiável e o mais frequentemente usado é a competência de desenvolvimento do ovócito in vitro, ou seja, o momento da primeira clivagem do zigoto (Van Soom et al. 1992). In vivo, as condições intrafoliculares são determinantes da qualidade do ovócito. Se aceita de forma geral que o mRNA materno e moléculas de proteínas são sintetizados e acumulados durante o crescimento e maturação do ovócito (Lonergan et al. 2003; van den Hurk e Zhao 2005) e são fundamentais para assegurar a sobrevivência do embrião antes da ativação do genoma embrionário, que ocorre no estágio de 8–16 células. Tanto a abundância de tais transcritos gênicos (mRNA) nos ovócitos, como também o grau de caudas poli(A) e seu estado de metilação estão relacionados à competência de desenvolvimento do ovócito e podem ser influenciados pelo ambiente de maturação (folicular) (Watson et al. 2000; Gandolfi e Gandolfi 2001). Além disso, existem outros parâmetros para estimar a qualidade do ovócito, tais como: aparência morfológica das células do cúmulo e ooplasma (de Loos et al. 1989; Hawk e Wall 1994), teor de lipídeos (Leroy et al. 2005b), avaliação da ultraestrutura do estágio nuclear e ooplasma (Revah e Butler 1996; Yaakub et al. 1997; O’Callaghan et al. 2000), presença de transcritos gênicos (Wrenzycki et al. 2000) e presença de marcadores de apoptose, que são utilizados de rotina (Yuan et al. 2005). Da mesma forma, vários parâmetros invasivos e não-invasivos (morfologia, número de células, cinética do desenvolvimento, apoptose e anomalias genéticas) foram descritos para avaliar a qualidade do embrião (revisão por Van Soom et al. 2003). A qualidade do embrião é predominantemente determinada pelo ambiente de cultivo e menos pela origem do ovócito (Lonergan et al. 2001; Knijn et al. 2002). Assim, o microambiente pósfertilização no oviduto e útero é fundamental e tem importante impacto sobre a qualidade do embrião (metabolismo e expressão gênica) (Wrenzycki et al. 2000; Rizos et al. 2002).

Aplicando estes conhecimentos para entender a ‘síndrome da sub-fertilidade de vacas leiteiras’, Britt (1992) levantou a hipótese de que a competência de desenvolvimento do ovócito e a capacidade esteroidogênica do folículo em vacas leiteiras de alta produção seriam determinadas pelo ambiente bioquímico durante o longo período (até 80 dias) de crescimento folicular antes da ovulação. Assim, folículos primários expostos a condições adversas associadas ao período de desafio metabólico de BEN no pós-parto imediato poderiam ser menos capazes de produzir teores adequados de estrógenos e progesterona (depois da ovulação) (Britt 1992; Roth et al. 2001a, b). Além disso, tais folículos estariam condenados a conter um ovócito de qualidade inferior, que seria ovulado aos 60–80 dias após o parto. Finalmente, no caso de desenvolvimento de um embrião, o micro-ambiente do oviduto e útero poderia ser hostil e impedir o desenvolvimento normal (Boland et al. 2001; McEvoy et al. 2001; Kenny et al. 2002). Em conclusão, a hipótese de Britt reforça o temor de que a qualidade de ovócitos e embriões de vacas leiteiras de alta produção está sendo ameaçada. No texto a seguir, procederemos a uma revisão das evidências científicas que confirmam ou negam esta importante hipótese.

EFEITOS ADVERSOS DO BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO NA QUALIDADE DO OVÓCITO

Ligação endócrina entre o balanço energético negativo e a qualidade do ovócito

A foliculogênese é um processo bastante complexo, mas finamente sintonizado, em que sinais endócrinos e parácrinos desempenham importante papel (ver revisão de Webb et al. 2004). A capacidade de desenvolvimento do ovócito está intimamente ligada à fase de crescimento e saúde do folículo em desenvolvimento (Bilodeau-

Goeseels e Panich 2002; Sutton et al. 2003; Lequarre' et al. 2005). Se aceita de forma geral que o BEN e a perda concomitante de peso podem interferir com este processo bem orquestrado de crescimento folicular em nível de eixo hipotalâmico-pituitário-ovariano (Beam e Butler 1997; Lucy 2000, 2003; Armstrong et al. 2002a; Gong 2002; Webb et al. 2004). Em primeiro lugar, níveis reduzidos de insulina e fator de crescimento I semelhante à insulina (IGF-I), teores mais elevados de hormônio de crescimento (GH) e provavelmente também concentrações reduzidas de leptina representam os principais mecanismos endócrinos através dos quais o crescimento folicular pode ser diretamente (via alteração da sensibilidade do ovário às gonadotrofinas) ou indiretamente (via concentrações e pulsatilidade reduzidas de LH) inibido em vacas leiteiras de alta produção (Gong 2002; Lucy 2003; Webb et al. 2004). Em segundo lugar, foi recentemente relatado que as vacas em lactação, ao contrário de vacas não lactantes, apresentam folículos dominantes com menor secreção estrogênica. Estes folículos, portanto, necessitam de uma fase de crescimento mais prolongada para aumentar seu diâmetro para desencadear uma frequência adequada de pulsos e pico de LH (Lopez et al. 2004; Sartori et al. 2004). Além da redução da produção de estrógeno, há maior metabolização hepática dos hormônios durante o BEN, devido ao maior plano nutricional, que também poderia contribuir para a redução dos níveis préovulatórios de estrógeno em vacas leiteiras em lactação, em comparação a novilhas não lactantes (Sangsrivong et al. 2002). Já foi demonstrado que concentrações alteradas de estrógeno interferem com a maturação nuclear, provavelmente por afetar a formação do fuso e a organização dos microtúbulos (Beker et al. 2002; Beker-van Woudenberg et al. 2004). Além disso, estes perfis endócrinos aberrantes podem explicar a tendência de crescimento folicular mais prolongado e, desta forma, o retardo ou mesmo a anovulação observada em vacas leiteiras de alta produção (Lucy 2003). Ainda assim, as consequências finais das alterações de crescimento e função folicular sobre a qualidade intrínseca do ovócito ainda não são totalmente conhecidas. Lucy (2001) comparou o problema do retardo da ovulação a folículos persistentes, que frequentemente contêm um ovócito de qualidade inferior devido à maturação nuclear prematura. Isto pode ser explicado por fluxo reduzido de substâncias que interrompem a meiose das células da granulosa para o ovócito (Revah e Butler 1996). Vos et al. (1996), entretanto, não observaram nenhum efeito adverso do retardo de 16 horas do pico de LH sobre a competência de ovócitos maturados *in vitro*.

Um dos principais efeitos negativos do BEN é a alteração da frequência e da amplitude dos pulsos de hormônio luteinizante (LH), resultando em intervalos prolongados entre o parto e a primeira ovulação (Lucy 2003; Webb et al. 2004). Uma pulsatilidade correta de LH é também considerada extremamente importante para a finalização do crescimento e da maturação do ovócito (Hyttel et al. 1997). O pico préovulatório de LH é o sinal crítico para a retomada da progressão da meiose de metáfase I para II, que assegura a competência de desenvolvimento do ovócito préovulatório (Hyttel et al. 1997; Rizos et al. 2002; Humblot et al. 2005). Como não existem receptores de LH no ovócito, os sinais que sinalizam sua maturação são, portanto, provavelmente originados nas células circundantes do cúmulo (van den Hurk e Zhao 2005). Um pico acentuado de LH desencadeia a mudança no perfil de produção de esteróides pelas células da granulosa, passando de um ambiente predominantemente estrogênico para um ambiente progressivamente progestogênico, necessário para a retomada da meiose (van den Hurk e Zhao 2005). Lindsey et al. (2002) demonstraram que, em novilhas tratadas com implantes de agonista de GnRH, tanto a secreção pulsátil de LH quanto o pico préovulatório de LH são especialmente necessários para assegurar boa maturação citoplasmática do ovócito e não são essenciais para a maturação nuclear. Os ovócitos coletados neste estudo sofreram clivagem depois da FIV, mas não houve formação de blastocistos (Lindsey et al. 2002).

Às 18 horas depois do pico de LH, o teor intrafolicular de esteróides contém praticamente 90% de progesterona (Silva e Knight 2000). Secreção préovulatória adequada de progesterona pelas células da granulosa é fundamental para a interregulação correta das junções tipo "gap" nestas células, isolando o complexo cúmulo- ovócito e reduzindo assim as concentrações de estrógeno no ovócito abaixo do limiar para manter a parada da meiose (McEvoy et al. 1995). Além disso, acredita-se que a progesterona esteja envolvida

no processo de poli-adenilação do mRNA materno, regulando assim a expressão de genes importantes para o desenvolvimento do ovócito (McEvoy et al. 1995). A mobilização de gordura decorrente do BEN resulta em liberação de progesterona armazenada em lipídeos (Hamudikuwanda et al. 1996; Rabiee et al. 2002), levando a níveis supra-basais de progesterona. Tanto em novilhas (Bage 2003) quanto em vacas leiteiras em lactação (Waldmann et al. 2001), níveis supra-basais ($>0,5$ nmol/l) de progesterona no momento da IA resultam em taxas de concepção significativamente mais baixas. Além disso, é importante mencionar que a interpretação de possíveis efeitos dos esteróides sobre a qualidade do ovócito é ainda mais complicada pela presença de proteínas de ligação de esteróides no fluido folicular (FF) (Yding-Andersen 1990).

Recentemente, a leptina, ou o produto do gene da obesidade, foi implicada na interação entre nutrição e fertilidade em vacas leiteiras de alta produção (Keisler et al. 1999; Denniston et al. 2003; Liefers et al. 2003). Mais precisamente, foi demonstrado que a leptina estimula a progressão da meiose durante a maturação de ovócitos *in vitro*, tem efeito anti-apoptótico sobre as células do cúmulo que circundam o ovócito e promove a competência do ovócito maduro, o que resulta em maior número de blastocistos de melhor qualidade (Boelhauve et al. 2005; Paula-Lopes et al. 2007). A queda nas concentrações plasmáticas de leptina em decorrência de jejum é perfeitamente refletida nas concentrações de leptina do FF em leitoas pré-púberes (Govoni et al. 2005). Ainda não se sabe se o mesmo ocorre em vacas leiteiras durante o período de BEN. Entretanto, os estudos acima mencionados sugerem que a leptina poderia ser um fator chave na conexão entre níveis de energia e qualidade do ovócito em vacas leiteiras de alta produção. As concentrações de insulina são reduzidas em vacas leiteiras durante o período de BEN, logo após o parto (Beam e Butler 1997). A insulina não só promove a resposta folicular às gonadotrofinas (Frajblat e Butler 2000) e, portanto, o crescimento folicular, mas provavelmente também tem efeitos estimulantes diretos sobre o ovócito em processo de maturação (Butler e Smith 1989). Informações específicas sobre a influência direta ou impacto de baixas concentrações de insulina sobre o crescimento e/ou maturação do ovócito em vacas leiteiras são praticamente inexistentes.

IGF-I – As concentrações séricas e no FF de *fator de crescimento semelhante à insulina* em vacas leiteiras apresentam correlação positiva com os níveis de energia e são essenciais para o desenvolvimento folicular normal (Beam e Butler 1997; McCaffery et al. 2000; Walters et al. 2002a; van den Hurk e Zhao 2005). Velazquez et al. (2005) recentemente descreveram uma correlação positiva entre as concentrações séricas de IGF-I em doadoras e o número de embriões viáveis recuperados depois de superovulação. Em base nesta observação, propuseram que haveria um efeito de estimulação do fator de crescimento no folículo e no ovócito. Os receptores de IGF-I (Tipo 1) e as proteínas de ligação de IGF (IGFBP) já foram descritos em ovócitos bovinos e células do cúmulo tanto em folículos pré-antrais quanto antrais, sugerindo que o IGF-I regula diretamente o crescimento e a maturação do ovócito (Armstrong et al. 2002b; Nuttinck et al. 2004). De acordo com estudos *in vitro*, IGF-I tem o poder de estimular a maturação do ovócito (Izadyar et al. 1997; Pawshe et al. 1998) e de promover a formação do embrião, mantendo sua qualidade (Sirisathien e Brackett 2003). Finalmente, é importante ressaltar que especialmente as proteínas de ligação de IGF-I, que modulam a bio-atividade do hormônio e não as concentrações de IGF-I em si, sofrem alteração no caso de distúrbio do balanço de energia (Spicer et al. 1992; Comin et al. 2002). Certamente ainda são necessárias mais pesquisas sobre este assunto tão intrigante.

Distúrbios endócrinos decorrentes do BEN geralmente resultam em anovulação e atresia do folículo dominante e não na ovulação de um ovócito de qualidade inferior. Entretanto, jamais foi comprovado se os distúrbios endócrinos durante as primeiras semanas pós-parto teriam efeitos adversos de longo prazo sobre a qualidade de um ovócito ovulado dois meses depois (Figura 1). Como já mencionado anteriormente, esta possibilidade foi levantada pela primeira vez por Britt (1992) e é conhecida como ‘a hipótese de Britt’.

Correlação metabólica entre balanço energético negativo e qualidade do ovócito

Ao contrário do grande número de estudos conduzidos sobre distúrbios endócrinos, existem somente poucos estudos a respeito dos possíveis efeitos dos parâmetros metabólicos típicos do BEN, tais como baixos níveis de glicemia, elevação dos níveis de -hidroxibutirato (-OHB) ou de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) sobre a qualidade do ovócito. Folículos quiescentes apresentam uma parede sem continuidade e uni-laminar e, devido às múltiplas porosidades e irregularidades, conferem somente isolamento parcial do ovócito do estroma circundante, resultando em praticamente contato direto entre ovócito e sangue (Zamboni 1974). Assim, neste estágio de quiescência, vários tipos de metabólitos podem facilmente ter acesso ao interior do folículo e provavelmente afetar o ovócito. Esta observação confirma a hipótese de Britt. À medida que o folículo cresce, o ovócito passa a ficar cada vez mais isolado do ambiente extra-folicular devido à formação da zona pelúcida, do FF, de diversas camadas de células da granulosa e da lâmina basal (barreira hemato-folicular) (Zamboni 1974). Ao atingir o diâmetro de folículo pré-ovulatório, a permeabilidade desta barreira hemato-folicular parece aumentar ainda mais (Edwards 1974; Bagavandoss et al. 1983). Edwards (1974) já havia sugerido que certos agentes, capazes de interferir com a saúde do ovócito, poderiam ser introduzidos no folículo pré-ovulatório e o trabalho de Loos et al. (1991) ressaltou o estreito contato metabólico entre as células do cúmulo e do ovócito através de terminações que penetram na zona pelúcida. Recentemente demonstramos através de um modelo de coleta transvaginal seriada de FF de vacas leiteiras de alta produção no pós-parto imediato, que o folículo em processo de crescimento e maturação está diretamente exposto às alterações de bioquímica sérica associadas ao BEN (Leroy et al. 2004). Entretanto, evidências científicas de efeitos residuais de longo prazo de tais alterações metabólicas sobre a competência de desenvolvimento do ovócito em vacas leiteiras de alta produção (hipótese de Britt) são ainda escassas. Aparentemente, o único efeito adverso de longo prazo que afeta a capacidade do ovócito ser fertilizado e que pode ser demonstrado é a ocorrência de estresse calórico 50–20 dias antes da IA (Roth et al. 2001b; Chebel et al. 2004). Nos estudos revisados para este trabalho, somente efeitos de curto prazo foram investigados, pois estudos in vitro para a avaliação de efeitos de longo prazo (60–80 dias) de metabólitos específicos sobre a qualidade do ovócito são praticamente impossíveis de ser realizados.

Além dos efeitos indiretos da hipoglicemia na moderna vaca leiteira no pós-parto imediato (via influência com a secreção de LH ou responsividade ovariana às gonadotrofinas), também pode ser levantada a hipótese de que glicemia muito baixa também pode afetar diretamente a qualidade do ovócito. Landau et al. (2000) demonstraram que as concentrações de glicose no FF podem ser alteradas de acordo com o estado nutricional. Também observamos uma forte correlação entre glicemia e concentrações de glicose no FF. Entretanto, é importante mencionar que o folículo é capaz de isolar o ovócito de níveis séricos extremamente baixos de glicose (Leroy et al. 2004). Nas células do cúmulo, a glicose é primariamente convertida através da via glicolítica em piruvato e lactato, que são os substratos preferenciais do ovócito para a produção de ATP (Cetica et al. 2002; revisado por Sutton et al. 2003). No ovócito, por outro lado, a glicose é predominantemente metabolizada através da via da pentose fosfato (PPP) para síntese de DNA e RNA (Sutton et al. 2003). Apesar do nível relativamente baixo de utilização, a glicose é uma molécula indispensável durante a maturação do ovócito, especialmente pelo fato de que a atividade da PPP está envolvida na progressão da meiose e não em glicólise (produção de ATP), sendo crítica para a capacitação do ovócito (Downs e Utecht 1999; Cetica et al. 2002; Sutton et al. 2003). A adição de glicose ao meio de maturação in vitro melhora a expansão do cúmulo, a maturação nuclear, a clivagem do embrião e o desenvolvimento do blastocisto (Krisher e Bavister 1998; Sutton-McDowall et al. 2004; Bilodeau-Goeseels 2006). A maturação de ovócitos em concentrações de glicose observadas no FF de vacas em cetose clínica (1,4 mM de glicose) resulta em efeito negativo significativo sobre a competência (Leroy et al. 2006b). Assim, pode-se concluir que as condições de hipoglicemia, aliadas ao BEN, são refletidas no microambiente do ovócito pré-ovulatório e provavelmente comprometem a capacidade de desenvolvimento do ovócito (Figura 1).

Durante o p  sparto imediato, todas as vacas leiteiras de alta produ  o passam por um período de BEN, durante o qual a mobiliza  o de reservas corporais de gordura    essencial para atender as necessidades de energia para manuten  o e produ  o de leite (Chilliard et al. 1998). Em particular, os tipicamente baixos níveis de glicose e de insulina, associados a altas concentra  es de hormônio de crescimento e ao estresse (catecolaminas), regulam as enzimas lipogênicas e lipolíticas no tecido adiposo (Vernon 2002). As concentra  es plasmáticas de AGNEs estão positivamente correlacionadas ao grau de déficit de energia e podem potencialmente enviar um sinal referente ao status nutricional aos centros neurais (Walters et al. 2002a). A maciça mobiliza  o de lipídeos pode resultar em esteatose hepática (Vernon 2002), afetando a fun  o hepática, o que por sua vez pode afetar negativamente a fertilidade (Rukkwamsuk et al. 1999). Kruip e Kemp (1999) sugeriram possíveis efeitos tóxicos diretos de altas concentra  es de AGNEs no ovário. Recentemente, demonstramos que altos níveis de AGNEs, associados ao BEN, são refletidos no FF de folículos dominantes em vacas leiteiras imediatamente após o parto (Leroy et al. 2005c). Além disso, aplicamos este conhecimento a um modelo in vitro, em que o meio de matura  o do ovócito foi suplementado com os principais ácidos graxos em concentra  es semelhantes às observadas no FF de vacas leiteiras durante um episódio de BEN. Os resultados demonstraram que principalmente os ácidos graxos saturados de cadeia longa (tais como:   cido palmítico e esteárico) inibiram a taxa de matura  o, levando a taxas relativamente baixas de fertiliza  o, clivagem e forma  o de blastocistos. A indu  o de apoptose e mesmo necrose das células do c  mulus durante a matura  o poderia explicar estas observa  es (Leroy et al. 2005c). Jorritsma et al. (2004) demonstraram efeitos tóxicos de concentra  es supra-fisiológicas de ácido oléico ligado    albumina sobre a matura  o do ovócito, enquanto Homa e Brown (1992) descreveram efeitos semelhantes de ácido linoleico. O efeito citotóxico de AGNEs também foi relatado em outros tipos celulares, como células de Leydig (Lu et al. 2003), células da granulosa bovina (Vanholder et al. 2005), células da granulosa humana (Mu et al. 2001) e células   -pancreáticas (Cnop et al. 2001). Em base nestas observa  es, pode-se afirmar que os efeitos tóxicos de altas concentra  es de AGNEs sobre a qualidade do ovócito podem ser uma das maneiras através das quais o BEN exerce seus efeitos negativos sobre a fertilidade de vacas leiteiras de elite. Novamente,    importante observar que o modelo combinado in vivo e in vitro descrito acima (Leroy et al. 2005c) não    apropriado para a investiga  o dos efeitos de longo prazo de altas concentra  es de AGNEs que perduram por vários dias ou até mesmo semanas. No modelo ideal, folículos primários deveriam ser cultivados sob o efeito de altos teores de AGNEs por várias semanas. Até o momento, tal abordagem    infelizmente impraticável, o que também se aplica a estudos similares relacionados, por exemplo, aos efeitos de baixas concentra  es de glicose ou de altos teores de uréia ou   -OHB.

Altas concentra  es de *corpos cet  nicos*, outra característica metabólica importante do BEN, foram associadas    depressão do sistema imunológico, através de efeitos tóxicos diretos sobre as células de imunidade (Franklin et al. 1991; Hoebe et al. 1997). Vacas leiteiras de alta produ  o são mais suscetíveis a todos os tipos de infec  es (como mastite, endometrite), o que pode suprimir indiretamente a fertilidade. Altas concentra  es de   -OHB são perfeitamente refletidas no FF e alteram diretamente o micro-ambiente do ovócito em processo de matura  o durante o período de p  sparto imediato (Leroy et al. 2004). Modelos de matura  o in vitro em que foram reproduzidas as condi  es clínicas de cetose demonstraram efeito negativo sobre a qualidade do ovócito. Na verdade, o efeito negativo foi causado mais provavelmente pelas baixas concentra  es de glicose que pelo efeito de altos níveis de   -OHB (Leroy et al. 2006b). Em outras palavras, não foram demonstrados efeitos tóxicos diretos decorrentes de altos níveis de corpos cet  nicos na qualidade do ovócito.

Durante o período de p  sparto imediato em vacas leiteiras, ocorre também importante catabolismo de prote  inas, além da intensa mobiliza  o de lipídeos. A deamina  o de prote  inas e detoxifica  o podem resultar em concentra  es sist  micas elevadas de uréia. Além das altas concentra  es de am  nia, estes níveis elevados de uréia também são detectados no FF (Sinclair et al. 2000; Leroy et al. 2004) e podem ser tóxicos para o

ovócito (Sinclair et al. 2000; De Wit et al. 2001). Entretanto, sabe-se que as altas concentrações de uréia, associadas a efeitos negativos sobre a fertilidade, são decorrentes principalmente da ingestão de dietas com altos teores de proteína. Os efeitos da dieta sobre a qualidade do ovócito e do embrião, entretanto, estão além do escopo da presente revisão, mas são abordados em trabalho complementar (Leroy et al. 2008).

Medidas adequadas de manejo podem reduzir a duração e a intensidade do BEN e minimizar seu impacto sobre as funções endócrinas e metabólicas. Desta forma, vacas leiteiras normalmente recebem dietas ricas em energia (geralmente à base de altos teores de amido ou gorduras). Já foi claramente demonstrado que dietas glicogênicas são benéficas para a fertilidade, uma vez que estimulam a retomada das vias normais de sinalização endócrina, levando à retomada mais precoce da atividade ovariana (Gong 2002; Van Knegsel et al. 2005). Esta é outra maneira através da qual é possível evitar os efeitos negativos sobre a qualidade do ovócito e das células da granulosa (como descrito acima) causados diretamente por níveis elevados de AGNEs e hipoglicemia. O fornecimento de dietas ricas em energia e proteína depois do período de BEN para elevar o rendimento leiteiro pode afetar a qualidade do ovócito e do embrião de forma direta ou indireta. Esta discussão, entretanto, não é objeto deste trabalho de revisão.

BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO E POSSÍVEIS EFEITOS RESIDUAIS SOBRE A CAPACIDADE ESTEROIDOGÊNICA DO CORPO LÚTEO, FUNÇÃO UTERINA E QUALIDADE DO EMBRIÃO

Boland et al. (2001) demonstraram que a determinação da qualidade do ovócito é fundamental para identificar se haverá ou não a formação de um embrião. O período pósfertilização, entretanto, é de vital importância para determinar a qualidade e, portanto, a viabilidade do embrião (Lonergan et al. 2001). O sucesso do desenvolvimento precoce do embrião depende de um balanço delicado e sincronizado entre o estabelecimento do sinal luteolítico no útero e a produção de um fator antiluteolítico pelo embrião, o interferon tau (IFN-tau). A secreção desta proteína depende do desenvolvimento de um embrião saudável e permite que se mantenha a secreção contínua de níveis adequados de progesterona através da inibição da produção de PGF2 α no endométrio (Mann e Lamming 2001; Goff 2002). Por sua vez, o crescimento normal do embrião depende tanto de sua competência inerente de desenvolvimento como da adequação do ambiente uterino. A maior parte das perdas embrionárias ocorre provavelmente antes do dia 14 de gestação e representa até 40% de todas as falhas gestacionais (Dunne et al. 2000; Silke et al. 2002). A mortalidade embrionária é a principal causa de fertilidade reduzida e já foi levantada a sugestão de que ocorre uma alteração do equilíbrio entre crescimento embrionário e reconhecimento materno da prenhez em vacas leiteiras de elite (Dunne et al. 2000; Silke et al. 2002). O principal hormônio para o desenvolvimento adequado do embrião e manutenção da prenhez é a progesterona (Mann e Lamming 2001; Mann et al. 2001).

Níveis adequados de progesterona são vitais para a manutenção da viabilidade do ovo, uma vez que modula as secreções endometriais e a receptividade uterina (McEvoy et al. 1995). Acredita-se que as baixas taxas de prenhez em vacas leiteiras de alta produção são resultado de uma combinação entre atraso na elevação dos níveis de progesterona depois da ovulação e níveis sub-ótimos durante a fase lútea (Mann e Lamming 2001). O BEN tipicamente observado no pós parto imediato contribui para a infertilidade em uma fase posterior da lactação ao reduzir o número de ciclos ovarianos. Um número suficiente de ciclos estrais ovulatórios antes da IA é fundamental para uma preparação adequada do útero (Butler 2003). Villa-Godoy et al. (1988) demonstraram que vacas que apresentaram BEN pós parto apresentavam níveis significativamente mais baixos de progesterona durante os três primeiros ciclos pós parto. Apesar do maior volume de tecido lúteo, em comparação a novilhas não lactantes, a concentração máxima de progesterona em vacas em lactação é claramente inferior (Sartori et al. 2004). Isto implica inibição da capacidade lútea de secreção de

progesterona ou maior taxa de metabolização hepática do hormônio, como foi demonstrado por Sangsritavong et al. (2002). Na verdade, como já foi demonstrado para os níveis de estrógeno, a maior metabolização dos hormônios esteróides no fígado também pode ser responsável pela redução dos níveis séricos de progesterona (Sangsritavong et al. 2002; Vasconcelos et al. 2003; Wiltbank et al. 2006). Vasconcelos et al. (2003) observaram uma correlação negativa entre o nível de produção de leite e a concentração de progesterona, provavelmente decorrente de diferenças no plano de nutrição refletidas em variações de metabolismo hepático (Rabiee et al. 2002; Butler 2003; Vasconcelos et al. 2003).

Como já foi mencionado anteriormente, as concentrações de progesterona no sangue periférico nos dias 0 e 1 depois do pico de LH são fundamentais para a sobrevivência do embrião em ovinos, provavelmente devido a modificações que ocorrem nos estágios finais da maturação do ovócito (Ashworth et al. 1989; McEvoy et al. 1995). Outros estudos em ovelhas, entretanto, demonstraram que o efeito positivo da progesterona ocorre predominantemente no útero (Lozano et al. 1998). Embriões recuperados de vacas com altos níveis circulantes de progesterona eram mais desenvolvidos e produziam maiores teores de INF-tau que embriões obtidos de vacas cujas concentrações de progesterona eram mais baixas (Mann e Lamming 2001). Recentemente, Green et al. (2005) demonstraram que a capacidade de desenvolvimento do embrião de vacas leiteiras está intimamente ligado tanto às concentrações plasmáticas quanto luteais de progesterona já no dia 5 pós-IA (antes da presença do sinal de IFN-tau). Tanto o momento quanto a intensidade da elevação dos níveis de progesterona são vitais para assegurar a sobrevivência do embrião. A suplementação de progesterona durante a elevação pós-ovulatória (dias 5–9) aumenta significativamente a capacidade de desenvolvimento do embrião e a produção de INF-tau, mas não tem efeito na fase lútea, (Mann et al. 2006). Provavelmente, isto ocorre por indução de algum tipo de modulação específica no ambiente do oviduto. Finalmente, Butler et al. (1996) ressaltaram a importância das elevadas concentrações de progesterona, tanto antes quanto depois da inseminação. É importante salientar que quase não existe correlação entre as concentrações sistêmicas de progesterona determinadas por punção da veia ovariana e os teores no endométrio (Lozano et al. 1998).

Sabe-se que outros hormônios relacionados aos níveis de energia do animal, como insulina e IGF-I, estimulam a produção de progesterona pelas células do corpo lúteo (Schams e Berisha 2004). Como a progesterona, o IGF-I também exerce efeito positivo direto sobre a saúde do embrião (Moreira et al. 2000). Atribui-se uma função de sinalização entre embrião e útero a este fator de crescimento, demonstrada pela expressão endometrial de IGF-II induzida pelo conceito e expressão endometrial de IGFBP-2 induzida por progesterona (Geisert et al. 1991; Watson et al. 1999). Além disso, o IGF é capaz de promover o desenvolvimento do embrião *in vitro*, como já mencionado anteriormente.

CONCLUSÕES

A fertilidade vacas leiteiras de alto rendimento está declinando e existe um corpo crescente de evidências que permite supor que a qualidade do ovócito e do embrião são os dois principais fatores implicados na complexa patogenia da falha reprodutiva, expressa em taxas decepcionantes de concepção e alta incidência de mortalidade embrionária precoce. O comprometimento do desenvolvimento folicular, alterações em níveis de esteróides e de hormônio de crescimento e fatores bioquímicos associados ao BEN e que afetam o ovócito provavelmente resultam na ovulação de um ovócito que não desenvolveu competência. Certamente, mais estudos são necessários para avaliar os complexos efeitos de longo prazo de tais alterações ambientais sobre os folículos primários em crescimento, que serão ovulados em várias semanas. Além disso, novos estudos deverão avaliar as alterações sofridas pelo microambiente do ovócito durante o período de BEN no modelo de vacas leiteiras de alta produção.

Mesmo que um ovócito seja ovulado e fertilizado com sucesso, ainda assim não há garantias de que a gestação chegará a termo. Os efeitos residuais do balanço energético negativo podem levar a uma função

inadequada do corpo lúteo, resultando em níveis sub-ótimos de progesterona. A combinação dos baixos teores de progesterona com níveis reduzidos de IGF pode ser responsável por criar um micro-ambiente uterino sub-ótimo, incapaz de sustentar a vida embrionária na fase inicial da gestação, levando a alta incidência de mortalidade embrionária precoce em vacas leiteiras de alta produção. Medidas adequadas de manejo podem ajudar a reduzir a duração e a intensidade do BEN, atenuando assim o impacto do balanço negativo de energia sobre as funções endócrinas e metabólicas em geral e sobre a qualidade do ovócito e do embrião em particular.

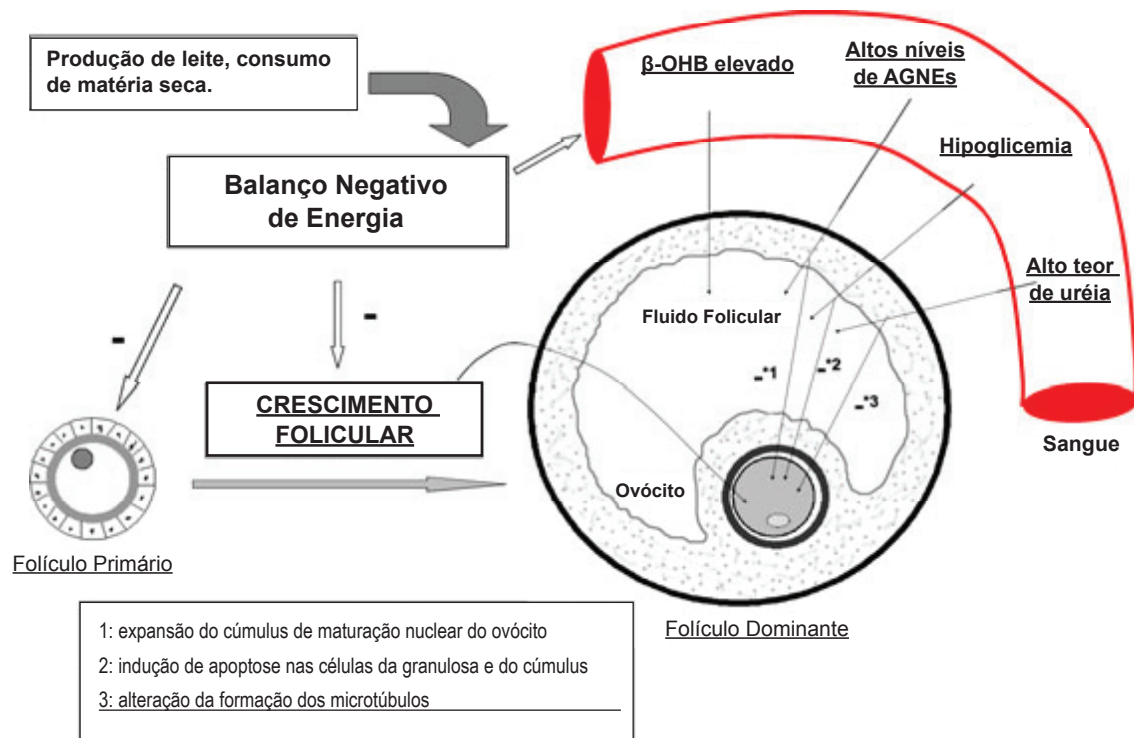


Figura 1. Mecanismos metabólicos correlacionando o balanço energético negativo e a qualidade do ovócito in vacas leiteiras de alta produção. Acredita-se que o balanço energético negativo afeta a saúde dos folículos primários e pode ter efeito residual sobre a qualidade do ovócito. O padrão alterado de crescimento folicular pode afetar o desenvolvimento de competência do ovócito. Parâmetros bioquímicos, associados ao balanço energético negativo, são também expressos no fluido folicular e podem afetar diretamente a competência do ovócito. AGNEs: Ácidos Graxos Não Esterificados, β-OHB: β-hidroxibutirato.

Tabela 1. Compilação de oito diferentes estudos sobre a qualidade do ovócito em vacas leiteiras de alta produção, publicados desde 1995.

Autor	Redução da qualidade do ovócito (Sim/Não)	Observações
Kruip et al. (1995)	Sim	Desenvolvimento in vitro de ovócitos de vacas em BNE é reduzido se comparado a vacas-controle (80–120 dias pp)
Kendrick et al. (1999)	Sim	Qualidade morfológica do ovócito declina depois do dia 30 pp
Gwazdauskas et al. (2000)	Sim	Qualidade morfológica do ovócito é maior no dia 28 pp que no dia 117 pp
Snijders et al. (2000)	Sim	Desenvolvimento de competência vitro de ovócitos de vacas de alto mérito genético é reduzido se comparado ao de vacas de baixo mérito genético
Wiltbank et al. (2001)	Sim	Qualidade morfológica do ovócito é maior em vacas leiteiras secas em comparação à de vacas em lactação
Walters et al. (2002b)	Sim	Qualidade morfológica do ovócito declina em vacas leiteiras em lactação depois do dia 70 pp
Argov et al. (2004)	Não	Não se observaram diferenças em qualidade morfológica e desenvolvimento do ovócito aos 73 e 263 dias pp.

BEN, balanço energético negativo; pp, pós-parto.

REFERÊNCIAS

- Argov N, Arav A, Sklan D, 2004: Number of oocytes obtained from cows by OPU in early, but not late lactation increased with plasma insulin and estradiol concentrations and expression of mRNA of the FSH receptor in granulosa cells. *Theriogenology* 61, 947–962.
- Armstrong DG, Gong JG, Webb R, 2002a: Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reproduction* 123 (Suppl.), 403–414.
- Armstrong DG, Baxter G, Hogg CO, Woad KJ, 2002b: Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reproduction* 123, 789–797.
- Ashworth CJ, Sales DI, Wilmut I, 1989: Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. *J Reprod Fert* 87, 23–32.
- Bagavandoss P, Midgley AR, Wicha M, 1983: Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 31, 633–640.
- Bage R, 2003: Conception rates after AI in Swedish Red and White dairy heifers: relationship with progesterone concentrations at AI. *Reprod Domest Anim* 38, 199–203.

- 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.
- Beker ARCL, Colenbrander B, Bevers MM, 2002: Effect of 17 β -estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology* 58, 1663–1673.
- Beker-van Woudenberg AR, van Tol HT, Roelen BA, Colenbrander B, Bevers MM, 2004: Estradiol and its membrane-impermeable conjugate (estradiol-bovine serum albumin) during in vitro maturation of bovine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton, and embryo quality. *Biol Reprod* 70, 1465–1474.
- Bilodeau-Goeseels S, 2006: Effect of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. *Theriogenology* 66, 297–306.
- Bilodeau-Goeseels S, Kastelic JP, 2003: Factors affecting embryo survival and strategies to reduce embryonic mortality in cattle. *Can J Anim Sci* 83, 659–671.
- Bilodeau-Goeseels S, Panich P, 2002: Effects of quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 71, 143–155.
- Boelhauve M, Sinowatz F, Wolf E, Paula-Lopes FF, 2005: Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro produced blastocysts. *Biol Reprod* 73, 737–744.
- 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.
- Bousquet D, Bouchard E, DuTremblay D, 2004: Decreasing fertility in dairy cows: myth or reality? *Le Med Vet* 34, 59–61.
- Britt JH, 1992: Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. *Proc Annu Conv Am Assoc Bovine Pract* 24, 39–43.
- Butler WR, 2003: Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in pp dairy cows. *Livest Prod Sci* 83, 211–218.
- Butler WR, Smith RD, 1989: Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J Dairy Sci* 72, 767–783.
- 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.
- Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M, 2002: Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction* 124, 675–681.
- 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.
- Chilliard Y, Bocquier F, Doreau M, 1998: Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod Fertil Develop* 38, 131–152.
- Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG, 2001: Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 50, 1771–1777.
- 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.
- 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.

- Denniston DJ, Thomas MG, Kane KK, Roybal CN, Canales L, Hallford DM, Remmenga MD, Hawkins DE, 2003: Effect of neuropeptide Y on GnRH-induced LH release from bovine anterior pituitary cell cultures derived from heifers in a follicular, luteal or ovariectomized state. *Anim Reprod Sci* 78, 25–31.
- Downs SM, Utecht AM, 1999: Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte-cumulus cell complexes. *Biol Reprod* 60, 1446–1452.
- Ducker MJ, Morant SV, Fisher WJ, Haggett RA, 1985: Nutrition and reproductive performance of dairy cattle. *Anim Prod* 41, 13–22.
- Dunne LD, Diskin MG, Sreenan JM, 2000: Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim Reprod Sci* 58, 39–44.
- Edwards RG, 1974: Follicular fluid. *J Reprod Fertil* 37, 189–219.
- Frajblat M, Butler WR, 2000: Metabolic effects of insulin and IGF-I in bovine ovarian follicle wall culture. *Biol Reprod* 62 (Suppl. 1), 293.
- Franklin ST, Young JW, Nonnecke BJ, 1991: Effects of Ketones, Acetate, butyrate, and glucose on bovine lymphocyte proliferation. *J Dairy Sci* 74, 2507–2514.
- Gandolfi TALB, Gandolfi F, 2001: The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* 55, 1255–1276.
- Geisert RD, Lee CY, Simmen FA, Zavy MT, Fliss AE, Bazer FW, Simmen RC, 1991: Expression of messenger RNAs encoding insulin-like growth factor-I, -II, and insulin-like growth factor binding protein-2 in bovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 45, 975–983.
- Goff AK, 2002: Embryonic signals and survival. *Reprod Domest Anim* 37, 133–139.
- Gong JG, 2002: Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest Anim Endocrinol* 23, 229–241.
- Govoni N, Galeati G, Castellani G, Tamanini C, 2005: Leptin concentrations in plasma and follicular fluid from prepubertal gilts as influenced by fasting, refeeding and insulin. *Horm Metab Res* 37, 152–158.
- Green MP, Hunter MG, Mann GE, 2005: Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 88, 179–189.
- 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.
- Hamudikuwanda H, Gallo G, Block E, Downey BR, 1996: Adipose tissue progesterone concentrations in dairy cows during late pregnancy and early lactation. *Anim Reprod Sci* 43, 15–23.
- Hawk HW, Wall RJ, 1994: Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 41, 1571–1583.
- Hoeben D, Heyneman R, Burvenich C, 1997: Elevated levels of beta-hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 58, 165–170.
- Homa ST, Brown CA, 1992: Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 94, 153–160.
- Humblot P, Holm P, Lonergan P, Wrenzycki C, Lequarre AS, Joly CG, Herrmann D, Lopes A, Rizos D, Niemann H, Callesen H, 2005: Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 63, 1149–1166. van den Hurk R, Zhao J, 2005: Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles.

- Theriogenology 63, 1717–1751.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T, 1997: Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47, 23–32.
- Izadyar F, Van Tol HT, Colenbrander B, Bevers MM, 1997: Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Mol Reprod Dev* 47, 175–180.
- Johnson WH, Gentry PA, 2000: Guest editorial. Optimization of bovine reproduction efficiency. *Vet J* 160, 10–12.
- Jorritsma R, Ce'sar M, Hermans JT, Kruitwagen CLJJ, Vos PLAM, Kruip TAM, 2004: Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro. *Anim Reprod Sci* 81, 225–235.
- Keisler DH, Daniel JA, Morrison CD, 1999: The role of leptin in nutritional status and reproductive function. *J Reprod Fertil Suppl* 54, 425–435.
- 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, Humpherson PG, Leese HJ, Morris DG, Tomos AD, Diskin MG, Sreenan JM, 2002: Effect of elevated systemic concentrations of ammonia and urea on the metabolite and ionic composition of oviductal fluid in cattle. *Biol Reprod* 66, 1797–1804.
- Knijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJ, Vos PL, Herrmann D, van der Weijden GC, Niemann H, Dieleman SJ, 2002: Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. *Reproduction* 124, 365–375.
- Krisher RL, Bavister BD, 1998: Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 49, 103–114.
- Kruip TAM, Kemp B, 1999: Voeding en vruchtbaarheid bij landbouwhuisdieren. *Tijdschr Diergeneeskd* 124, 462–467.
- Kruip TAM, Van Beek H, De Wit A, Postma A, 1995: Quality of bovine oocytes in dairy cows post partum: consequences for embryo production in vivo and in vitro. *Proceedings of 11th Conference of the ESET, Hannover, 8–9 September 1995*, pp. 113–119.
- 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.
- Lequarre' AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbies-Tran R, Callesen H, Mermillod P, 2005: Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 63, 841–859.
- Leroy JLMR, de Kruif A, 2006: Reduced reproductive performance in high producing dairy cows: is their actually a problem? *Vlaams Diergen Tijdschr* 75, 55–60.
- 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 ii: mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding cows. *Reprod Dom Anim*, doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00961.x.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Delange JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, Dewulf J, de Kruif A, 2004: Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in highyielding dairy cows early post partum. *Theriogenology* 62, 1131–1143.

- 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, 2022–2032.
- Leroy JLMR, Genicot G, Donnay I, Van Soom A, 2005b: Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. *Reprod Domest Anim* 40, 76–78.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, de Kruif A, Genicot G, Van Soom A, 2005c: Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on development capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 130, 485–495.
- Leroy JLMR, Van Soom A, de Kruif A, Opsomer G, 2006a: Modern research in the reduced fertility in high producing dairy cows: an innovative way of thinking. *Vlaams Diergen Tijdschr* 75, 18–22.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Opsomer G, Van Soom A, de Kruif A, 2006b: 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.
- Liefers SC, Veerkamp RF, te Pas MFW, Delavaud C, Chilliard Y, van der Lende T, 2003: Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight and estrus in dairy cows. *J Dairy Sci* 86, 799–807.
- Lindsey BR, Maclellan LJ, Whyte TR, Kinder JE, D’Occhio MJ, 2002: Differential requirements for pulsatile LH during the follicular phase and exposure to the preovulatory LH surge for oocyte fertilisation and embryo development in cattle. *Theriogenology* 58, 1651–1662.
- Lonergan P, Rizos D, Ward F, Boland MP, 2001: Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Fertil Develop* 41, 427–437.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP, 2003: Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim* 38, 259–267.
- de Loos F, van Vliet C, van Maurik P, Kruip TA, 1989: Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res* 24, 197–204.
- de Loos F, Kastrop P, Van Maurik P, Van Beneden TH, Kruip TA, 1991: Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* 28, 255–259.
- Lopez H, Satter LD, Wiltbank MC, 2004: Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 81, 209–223.
- Lozano JM, Abecia JA, Forcada F, Zarazaga L, Alfaro B, 1998: Effect of undernutrition on the distribution of progesterone in the uterus of ewes during the luteal phase of the estrous cycle. *Theriogenology* 49, 539–549.
- Lu ZH, Mu Y, Wang BA, Li XL, Lu JM, Li JY, Pan CY, Yanase T, Nawata H, 2003: Saturated free fatty acids, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis by stimulation of ceramide generation in rat testicular Leydig cell. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 1002–1007.
- Lucy MC, 2000: Regulations of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci* 83, 1635–1647.
- Lucy MC, 2001: Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci* 84, 1277–1293.
- Lucy MC, 2003: Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction Suppl* 61, 415–427.
- Mann GE, Lamming GE, 2001: Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121, 175–180.
- Mann GE, Merson P, Fray MD, Lamming GE, 2001: Conception rate following progesterone supplementation after second insemination in dairy cows. *Vet J* 162, 161–162.

- Mann GE, Fray MD, Lamming GE, 2006: Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- γ production in the cow. *Vet J* 171, 500–503.
- McCaffery FH, Leask R, Riley SC, Telfer EE, 2000: Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biol Reprod* 63, 267–273.
- 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, Robinson JJ, Ashworth CJ, Rooke JA, Sinclair KD, 2001: Feed and forage toxicants affecting embryo survival and fetal development. *Theriogenology* 55, 113–129.
- Moreira F, Risco CA, Pires MF, Ambrose JD, Drost M, Thatcher WW, 2000: Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 83, 1237–1247.
- Mu Y-M, Yanase T, Nishi Y, Tanaka A, Saito M, Jin C-H, Mukasa C, Okabe T, Nomura M, Goto K, Nawata H, 2001: Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. *Endocrinology* 142, 3590–3597.
- Nuttinck F, Charpigny G, Mermillod P, Loosfelt H, Meduri G, Freret S, Grimard B, Heyman Y, 2004: Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. *Domest Anim Endocrinol* 27, 179–195.
- 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.
- Opsomer G, Coryn M, Deluyker H, de Kruif A, 1998: An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. *Reprod Domest Anim* 33, 193–204.
- Paula-Lopes FF, Boelhauve M, Habermann FA, Sinowatz F, Wolf E, 2007: Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell independent and -dependent mechanisms. *Biol Reprod* 76, 532–541.
- Pawshe CH, Appa Rao KBC, Totey SM, 1998: Effect of insulin-like growth factor I and its interaction with gonadotropins on in vitro maturation and embryonic development, cell proliferation, and biosynthetic activity of cumulus-oocyte complexes and granulosa cells in buffalo. *Mol Reprod Dev* 49, 277–285.
- Rabiee AR, Macmillan KL, Schwarzenberger F, 2002: Plasma, milk and faecal progesterone concentrations during the oestrus cycle of lactating dairy cows with different milk yields. *Anim Reprod Sci* 74, 121–131.
- Revah I, Butler WR, 1996: Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fert* 106, 39–47.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P, 2002: Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61, 234–248.
- Roche JF, 2006: The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci* 96, 282–296.
- Roth Z, Meidan R, Shaham-Albalancy A, Braw-Tal R, Wolfenson D, 2001a: Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 121, 745–751.
- Roth Z, Arav A, Bor A, Zeron Y, Braw-Tal R, Wolfenson D, 2001b: Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction* 122, 737–744.

- Royal M, Mann GE, Flint APF, 2000: Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *Vet J* 160, 53–60.
- Rukkwamsuk T, Wensing T, Kruip TAM, 1999: Relationship between triacylglycerol concentrations in the liver and first ovulation in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 51, 1133–1142.
- Sangsritavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC, 2002: High feed intake increase liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17b in dairy cattle. *J Dairy Sci* 85, 2831–2842.
- 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.
- Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, Wiltbank MC, 2004: Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci* 87, 905–920.
- Schams D, Berisha B, 2004: Regulation of corpus luteum function in cattle – an overview. *Reprod Domest Anim* 39, 241–251.
- 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.
- Silva CC, Knight PG, 2000: Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 119, 261–269.
- Sinclair KD, Kuran M, Gebbie FE, Webb R, McEvoy TG, 2000: 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.
- Sirisathien S, Brackett BG, 2003: Tunel analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. *Mol Reprod Dev* 65, 51–56.
- 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.
- Spicer LJ, Crowe MA, Prendiville DJ, Goulding D, Enright WJ, 1992: Systemic but not intraovarian concentrations of insuline-like growth factor-I are affected by short-term fasting. *Biol Reprod* 46, 920–925.
- Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG, 2003: Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum. Reprod. Update* 9, 35–48.
- Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG, 2004: Cumulus expansion and glucose utilization by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction* 128, 313–319.
- Van Kneegsel 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 Fertil Develop* 45, 665–688.
- Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AE, Deluyker H, de Kruif A, 1992: Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38, 905–919.
- Van Soom A, Mateusen B, Leroy J, De Kruif A, 2003: Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reprod Biomed Online* 7, 664–670.
- 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.

- Vanholder T, Opsomer G, de Kruif A, 2006: Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Fertil Develop* 46, 105–119.
- 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.
- Velazquez MA, Newman M, Christie MF, Cripps PJ, Crowe MA, Smith RF, Dobson H, 2005: The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. *Theriogenology* 64, 1977–1994.
- Vernon RG 2002: Nutrient partitioning, lipid metabolism and relevant imbalances. *Proceedings of the 12th World Buiatrics Congress*, 18–23 August 2002, Hannover, Germany.
- Villa-Godoy A, Hughes TL, Emery RS, Chapin LT, Fogwell RL, 1988: Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 71, 1063–1072.
- Vos PLAM, van de Leemput EE, Zeinstra EC, Bevers MM, Dieleman SJ, 1996: Postponement of the preovulatory LH surge does not impair the developmental potential of in vivo matured oocytes from eCG /PG-superovulated heifers. *Theriogenology* 45, 329.
- Waldmann A, Reksen O, Landsverk K, Kommisrud E, Dahl E, Refsdal AO, Ropstad E, 2001: Progesterone concentrations in milk fat at first insemination – effects on non-return and repeat-breeding. *Anim Reprod Sci* 65, 33–41.
- Walters AH, Pryor AW, Bailey TL, Pearson RE, Gwazdauskas FC, 2002a: Milk yield, energy balance, hormone, follicular and oocyte measures in early and mid-lactation Holstein cows. *Theriogenology* 57, 949–961.
- Walters AH, Pryor AW, Bailey TL, Pearson RE, Gwazdauskas FC, 2002b: Parity-related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality, and hormones to 90 days postpartum. *J Dairy Sci* 85, 824–832.
- Watson AJ, Westhusin ME, Winger QA, 1999: IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *J Reprod Fertil Suppl* 54, 303–315.
- Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, Westhusin ME, 2000: Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol Reprod* 62, 355–364.
- Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG 2004: Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci* 83 (E. Suppl.), E63–E74.
- 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].
- Wiltbank M, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gu'men A, 2006: Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65, 17–29.
- Wrenzycki C, De Sousa P, Overstro'm EW, Duby RT, Herrmann 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, O'Dhoherty JV, Hyttel P, 1997: Effect of dietary intake on follicle numbers and oocyte morphology in unsuperovulated and superovulated ewes. *Theriogenology* 47, 182.
- Yding-Andersen C, 1990: Levels of steroid binding proteins and steroids in human preovulatory follicular fluid and serum as predictors of success in in vitro fertilisation embryo transfer treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 71, 1375–1381.
- Yuan YQ, Van Soom A, Leroy JLMR, Dewulf J, Van Zeveren A, de Kruif A, Peelman LJ, 2005: Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology* 63, 2147–2163.

Zamboni L, 1974: Fine morphology of the follicle cell-oocyte association. *Biol Reprod* 10, 125–149. 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