

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA– PPGZOO**

**ANA PAULA AGOSTINI**

**ÁCIDO PALMÍTICO SOBRE O CRESCIMENTO FOLICULAR E OVULAÇÃO**

**CHAPECÓ  
2022**

**ANA PAULA AGOSTINI**

**ÁCIDO PALMÍTICO SOBRE O CRESCIMENTO FOLICULAR E OVULAÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do título de mestre  
em Zootecnia pelo Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia da Universidade  
do Estado de Santa Catarina – UDESC.  
Orientador: Prof. Dr. Rogério Ferreira  
Coorientadora: Dra. Juliana Germano  
Ferst

**CHAPECÓ**

**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Agostini, Ana Paula  
Ácido palmítico sobre o crescimento folicular e ovulação /  
Ana Paula Agostini. -- 2022.  
41 p.

Orientador: Rogério Ferreira  
Coorientadora: Juliana Germano Ferst  
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste,  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2022.

1. Ácidos graxos não esterificados. 2. Balanço energético  
negativo. 3. Bovino. 4. Vaca. I. Ferreira, Rogério. II. Ferst,  
Juliana Germano. III. Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa  
de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

**ANA PAULA AGOSTINI**

**ÁCIDO PALMÍTICO SOBRE O CRESCIMENTO FOLICULAR E OVULAÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do título de mestre  
em Zootecnia pelo Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia, da Universidade  
do Estado de Santa Catarina – UDESC.  
Orientador: Prof. Dr. Rogério Ferreira

**BANCA EXAMINADORA**

Membros:

Dr. Rogério Ferreira  
Universidade do estado de Santa Catarina

Dr. Bernardo Gazzieira Gasperin  
Universidade Federal de Pelotas

Dra. Monique Tomazele Rovani  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Chapecó, 02 de setembro de 2022.

A minha família por todo amor e carinho.  
Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e pela oportunidade de realizar meus sonhos e objetivos e vencer todos os obstáculos.

À minha família, principalmente meus pais, Paulo Primo Agostini e Aparecida de Fatima Balin Agostini, por serem minha base e meus exemplos de dedicação e perseverança. As minha irmãs e minha sobrinha, por serem minhas conselheiras, amigas e incentivadoras. Agradeço por sempre ficarem ao meu lado em todas as situações e por me apoiarem nos momentos difíceis.

Aos meus orientadores, Rogério Ferreira e Juliana Germano Ferst por todos os ensinamentos, incentivos e auxílios a mim dedicados. Obrigada por nunca medirem esforços para me ajudar em todos os momentos.

Ao Dr. Bernardo Gazzieira Gasperin e sua equipe pelo auxílio e dedicação na realização do experimento.

À Universidade do Estado de Santa Catarina pela oportunidade de cursar o mestrado e ao colegiado do programa de Pós-graduação em Zootecnia pelos ensinamentos.

Ao CNPq, FAPESC e CAPES pelo apoio financeiro e possibilidade de estudo.

A todos aqueles que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

O balanço energético negativo (BEN) é frequentemente observado em vacas leiteiras após o parto, esse evento leva os animais a uma condição de estresse metabólico que tem sido associado a retorno tardio da ciclicidade, desenvolvimento de folículos sem ovulação e redução da fertilidade. Durante o BEN ocorre uma série de alterações, dentre as quais destacam-se as alterações hormonais e perda de gordura corporal a qual está associada a mobilização de gordura e aumento da concentração de ácidos graxos não esterificados (NEFAs) no sangue e no fluido folicular. Esse aumento na concentração de NEFAs já foi associado a atraso no desenvolvimento folicular, no entanto, os efeitos isolados dos NEFAs sobre o crescimento folicular e a ovulação não foram elucidados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar se a injeção intrafolicular de AP afeta o crescimento folicular e a ovulação. Descobertas deste estudo revelaram que o aumento da concentração de AP no fluido folicular não resulta em atraso no crescimento normal de folículos dominantes saudáveis, assim como não reduz suas taxas de crescimento, no entanto os dados sugerem uma redução na taxa ovulatória. Esses resultados indicam que concentrações intrafoliculares aumentadas de AP em vacas que não estão em estado BEN não resultam em efeitos prejudiciais sobre o crescimento folicular, porém podem reduzir a taxa ovulatória.

**Palavras-chave:** Ácidos graxos não esterificados; Balanço energético negativo; Bovino; Vaca.

## ABSTRACT

Negative energy balance (NEB) is often observed in dairy cows after calving, this event leads the animals to a condition of metabolic stress that has been associated with delayed return of cyclicity, development of anovulatory follicles and reduced fertility. During NEB, a series of changes occur, among which hormonal changes and loss of body fat are highlighted, which is associated with fat mobilization and increased concentration of non-esterified fatty acids (NEFAs) in blood and follicular fluid. This increase in the concentration of NEFAs has already been associated with delay in follicular development, however, the isolated effects of NEFAs on follicular growth and ovulation have not been elucidated. Therefore, the objective was to evaluate the effect of intrafollicular injection of palmitic acid (PA) on follicular growth and ovulation. Findings from this study revealed that increasing the concentration of PA in the follicular fluid does not result in a delay in the normal growth of healthy dominant follicles, nor does it reduce their growth rates, however the data suggest a reduction in the ovulatory rate. These results indicate that increased intrafollicular concentrations of PA in cows that are not in the NEB state do not result in harmful effects on follicular growth, but may reduce the ovulatory rate.

**Keywords:** Nonesterified fatty acids; Negative energy balance; Bovine; Cow.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Efeito da injeção intrafolicular de ácido palmítico (AP) no crescimento folicular .....	29
Figura 2 - Efeito da injeção intrafolicular de ácido palmítico (AP) na taxa de crescimento folicular .....	30
Figura 3 - Efeito da injeção intrafolicular de ácido palmítico (AP) na taxa de ovulação .....	30

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
AREG	Anfiregulina
BEN	Balanço energético negativo
BTC	Betacelulina
CCO	Complexo cumulus oócito
CsG	Células da granulosa
EGF	Fator de crescimento epidermal
<i>EGF-like growth factors</i>	Fatores de crescimento semelhantes ao EGF
EGFr	Receptor de crescimento epidermal
EREG	Epiregulina
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FSH	Hormônio folículo estimulante
GH	Hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
Gns	Gonadotrofinas
IGF-I	Fator de crescimento semelhante a insulina - I
LH	Hormônio luteinizante
LHr	Receptores de hormônio luteinizante
NEFAs	Ácidos graxos não esterificados
TGF $\alpha$	Fator de crescimento transformante alfa
IIF	Injeção intrafolicular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
2.1	CRESCIMENTO FOLICULAR E OVULAÇÃO.....	18
2.2	BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO (BEN) E MOBILIZAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DURANTE O BEN .....	22
2.3	ÁCIDOS GRAXOS NÃO ESTERIFICADOS (NEFAS) NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E OVULAÇÃO .....	24
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
3.1	DELINAMENTO EXPERIMENTAL.....	27
3.2	MANIPULAÇÃO DO CICLO ESTRAL .....	27
3.3	PREPARAÇÃO DO AP E INJEÇÃO INTRAFOLICULAR.....	27
3.4	ULTRASSONOGRAFIA.....	28
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	28
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>
	<b>ANEXO A – COMPROVANTE DO CEUA .....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O período de transição em fêmeas bovinas é considerado um momento crítico, pois durante esta fase ocorre um incremento da exigência de nutrientes, principalmente energia e simultaneamente, redução na capacidade de ingestão de alimentos (DUPONT; SCARAMUZZIL; REVERCHON, 2014). Esses eventos, associados às alterações metabólicas e endócrinas desencadeadas pelo parto e lactogênese, levam o animal a um estado de balanço energético negativo (BEN), em que o tecido adiposo é mobilizado com a finalidade de fornecer energia aos tecidos. O produto desta atividade lipolítica são os ácidos graxos não esterificados (NEFAs), os quais estão presentes nos fluidos biológicos na sua forma livre, ou seja, não estão ligados à qualquer fração lipídica (LEAN et al., 2013; VAN HOECK et al., 2014).

O período de BEN, associado à elevação dos níveis circulantes de NEFAs em fêmeas bovinas, é considerado um evento fisiológico e transitório. No entanto, inúmeros fatores podem gerar desequilíbrio entre a demanda de nutrientes e a ingestão de alimentos, resultando em alto risco para ocorrência de enfermidades sistêmicas e alterações reprodutivas (DRACKLEY & CARDOSO, 2014).

Os NEFAs presentes em maior concentração na circulação são o ácido oleico (AO; C18:1), ácido palmítico (AP; C16:0) e esteárico (AS; C18:0), os quais se encontram em proporções semelhantes no fluido folicular (LEROY et al., 2005a). A elevação da concentração sanguínea desses ácidos graxos já foi associada ao atraso a primeira ovulação após o parto, em consonância a isso a elevação da concentração intrafolicular dessas substâncias foi correlacionada a atraso no desenvolvimento do folículo dominante (GIULIODORI et al., 2011; FERST et al., 2020).

O AP é o segundo ácido graxo mais abundante na circulação e fluido folicular (LEROY et al., 2004, 2005). Este NEFA já teve seu efeito tóxico em células da granulosa (CsG) de ratos e suínos comprovado por Chen et al. (2019) e Shibahara et al. (2020), respectivamente. Chen et al. (2019) verificou redução da viabilidade e função das CsG, por sua vez Shibahara et al. (2020) constatou redução da proliferação e viabilidade dessas células. Resultados obtidos por Vanholder et al. (2005) sugerem que o AP é o NEFA que apresenta efeito inibitório mais significativo sobre a proliferação de CsG bovina *in vitro*, além de reduzir o número de células na mesma extensão independente da concentração utilizada (150µM, 300µM e 500µM). Recentemente nosso grupo (Ferst et al., 2021) demonstrou um aumento da

trimetilação na lisina 9 da histona H3 (H3K9me3) em células endometriais tratadas com AP. No entanto, esse aumento da trimetilação nas células endometriais não foi observado quando essas células foram expostas a outros ácidos graxos de forma isolada ou quando o AP foi associado aos ácidos oleicos e esteárico. Essa alteração epigenética pode estar relacionada com ação do AP na diminuição da expressão de alguns genes e consequentemente com alteração de rotas metabólicas. Esses dados sugerem 1) um efeito do AP no metabolismo de diferentes tipos celulares e 2) que os NEFAs apresentam ações diferentes quando utilizados de forma conjunta ou isolados, o que justifica o entendimento da ação de cada ácido graxo.

As substâncias que podem ter efeito sobre a reprodução vêm sendo amplamente investigadas através de modelos de estudo *in vitro* e *in vivo*, os quais apresentam algumas vantagens e desvantagens. Os estudos *in vitro* nos permitem controlar as condições experimentais e produzir numerosos grupos para avaliação de diferentes tratamentos, no entanto, neste modelo as estruturas estudadas não são exposta as mesmas condições do ambiente em que estão inseridas *in vivo*, além de não ser possível avaliar processos foliculares como formação do antro e ovulação (DOKE & DHAWALE, 2013; ROVANI, M.T. et al., 2017). Por sua vez, no modelo *in vivo* com uso de injeção intrafolicular (IIF) é possível estudar mecanismos em ambiente endócrino fisiológico com interação entre CsG, células da teca e óocito, no entanto este modelo limita os estudos em relação as substâncias que podem ser empregadas e tempo de exposição (ROVANI, M.T. et al., 2017). Com base nessas informações, é possível concluir que o método de IFI pode ser utilizado para avaliação dos efeitos dos NEFAs sobre os folículos antrais, porém segundo DRACKLEY & CARDOSO (2014) há evidências de que as vacas que se encontram em BEN são expostas aos NEFAs por semanas após o parto desta forma o principal fator limitante das injeções intrafoliculares neste tipo de avaliação é a dificuldade de exposição dos folículos a altas concentrações de NEFAs por períodos prolongados como ocorre em animais no pós parto.

Diante das evidências dos efeitos do AP sobre as células dos órgãos reprodutivos e considerando que a eficiência reprodutiva depende de uma série de eventos fisiológicos que podem ser afetados por esse metabólito, torna-se evidente que a elevação nos níveis de AP durante o BEN é um potencial causador de prejuízos à fertilidade dos animais. O entendimento do efeito do AP sobre o crescimento folicular e ovulação colabora com a elucidação das vias pelas quais o BEN influência a

eficiência reprodutiva em bovinos, além de agregar conhecimento a respeito do impacto da nutrição sobre a reprodução. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar se a injeção intrafolicular de AP afeta o crescimento folicular e a ovulação.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CRESCIMENTO FOLICULAR E OVULAÇÃO

A função ovariana na fêmea bovina é regulada por uma complexa interação entre mecanismos de feedback sistêmico e locais envolvendo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) hipotalâmico e gonadotrofinas (Gns) hipofisárias, além de esteroides, fatores de crescimento e peptídeos ovarianos (FERREIRA, 2010). Os hormônios, peptídeos e fatores de crescimento envolvidos nesta regulação atuam em diferentes etapas do ciclo estral desde o recrutamento e crescimento folicular até a ovulação.

Os folículos ovarianos, considerados a unidade funcional dos ovários se formam, crescem e sofrem maturação oocitária durante um evento denominado foliculogênese. O início da foliculogênese se dá com a ativação dos folículos primordiais e culmina com o estágio de folículo pré-ovulatório (PICTON, 2001). A ativação dos folículos primordiais ocorre de forma contínua não sendo depende da ação de Gns, mas sim de fatores de crescimento e diferenciação intraovarianos liberados pelo oócito e CsG, como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF $\alpha$ ) e fator de crescimento fibroblástico (FGF) (DRION et al., 2000; WEBB et al., 2004; KNIGHT & GLISTER, 2006). A partir do recrutamento folicular os folículos passam por diversas alterações morfológicas e funcionais no oócito e células somáticas adjacentes, essas alterações dão algumas características próprias à cada estágio de desenvolvimento.

Os folículos primordiais inicialmente ativados possuem um diâmetro de aproximadamente 40 $\mu$ m. No interior destes folículos um oócito em estágio diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica encontra-se circundado por uma camada de CsG achadas. Quando os folículos em crescimento atingem um diâmetro médio de 60-80 $\mu$ m e o oócito encontra-se circundado por uma camada de CsG cúbicas, estes folículos passam a ser denominados folículos primários. Neste estágio de desenvolvimento, o oócito inicia a secreção de glicoproteínas que dão origem à zona pelúcida. O estágio seguinte de desenvolvimento são os folículos secundários, estes possuem um diâmetro aproximado de 200-400 $\mu$ m, a zona pelúcida está bem diferenciada, e o oócito é circundado por 2-3 camadas de CsG cúbicas que formam a

granulosa. Os estágios de desenvolvimento folicular citados são considerados independentes da ação de Gns (HANZEN; LOURTIE; DRION, 2000).

Os últimos estágios de desenvolvimento que os folículos podem alcançar são: folículos terciários e pré-ovulatórios, os quais são dependentes da ação de Gns. Os folículos terciários possuem um diâmetro de 3-4 mm e são caracterizados pela formação do antro. O desenvolvimento deste antro acontece de forma progressiva resultando na separação das CsG em células do cumulus e células murais. As células do cumulus por sua vez se diferenciam em corona radiata, camada de células posicionada ao redor do oócito. Tanto as células cumulus, quanto as células da corona radiata têm muitas junções GAP, consideradas um meio de comunicação entre o oócito e cavidade folicular (HANZEN; LOURTIE; DRION, 2000). A fase final de desenvolvimento folicular são os folículos pré-ovulatórios, estes folículos possuem atividade mitótica mínima das CsG e células da teca interna e externa bem diferenciadas, além disso o diâmetro aproximado desses folículos é de 10 a 12 mm em zebuíños (BORGES et al., 2003) e 15 a 20 em taurinos (WOLFENSON et al., 2004).

O conjunto de folículos em fase de dependência de Gns são denominados folículos antrais e iniciam esta fase com um diâmetro aproximado de 3 a 5 mm. A cada ciclo estral, entre o 1º e 2º dia, um pool de aproximadamente 24 desses folículos são recrutados em um evento denominado emergência folicular, que ocorre em resposta ao aumento nos níveis de hormônio folículo estimulante (FSH) (WILTBANK et al., 2000; DRIANCOURT, 2001; MIHM et al., 2002; ADAMS et al., 1992). Esses folículos crescem em padrão de ondas, podendo ser observadas duas a três ondas foliculares por ciclo (SIROIS & FORTUNE, 1988).

Durante a onda folicular os folículos produzem quantidade crescente de estradiol, este hormônio estimula a síntese de inibina pelas CsG que por sua vez reduz gradativamente a liberação de FSH hipofisário. O processo de redução da concentração de FSH ocorre entre o 2º e 3º dia após o recrutamento folicular, tendo como resultado a atresia de folículos subordinados dependentes deste hormônio e seleção de um folículo dominante com aproximadamente 8,5 mm (GINTHER et al., 2002; BEG et al., 2003; SIDDIQUI & GINTHER, 2014). O folículo que se torna dominante além de ser capaz de crescer e se diferenciar em baixas concentrações de FSH, apresenta maior nível de mRNA para receptores de Gns, possui maiores concentrações de enzimas envolvidas na esteroidogênese (CYP19A1, CYP17A1,

CYP11A1, 3 $\beta$ -HSD, e StAR) (FORTUNE et al., 2001) e de fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) livre (RIVERA & FORTUNE, 2003), além de ser o primeiro folículo a expressar receptores de hormônio luteinizante (LH) nas CsG (BEG & GINTHER, 2006).

Após a divergência folicular, as CsG aumentam gradativamente a abundância de receptores funcionais para LH, o que é indispensável para que ocorra a ovulação (ROBERT et al., 2003; RICHARDS, 1980). Simultaneamente a isso, a concentração intrafolicular de estradiol aumenta de forma exponencial no folículo dominante, ao final do ciclo estral este aumento de estradiol associado a baixa concentração de progesterona, desencadeiam um rápido aumento de GnRH, que por sua vez induz um pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH). O LH promove a cascata de sinalização necessária para a liberação do complexo cumulus oócito (CCO) e formação do CL (SHOHAM et al., 1995; LIU; SHIMADA; RICHARDS, 2008).

O pico de LH hipofisário desencadeia uma reação inflamatória aguda nas CsG e células da teca do folículo pré ovulatório. Por sua vez, essa reação inflamatória provoca um aumento da atividade de proteases nas CsG e células da teca, a qual culmina com a degradação da matriz extracelular do tecido conectivo do ovário. Os componentes degradados da parede folicular são separados sob a força da pressão intrafolicular constante, assim o folículo se rompe liberando o CCO (ESPEY, 1994). Além disso, o pico de LH é responsável pela expressão de uma série de genes envolvidos com a ovulação e início da luteinização (RICHARDS, 2002; SCHUERMANN, et al., 2018).

Dentre os genes de maior importância para o processo ovulatório, estão os fatores de crescimento semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF-*like growth factors*), como anfiregulina (AREG), epiregulina (EREG) e betacelulina (BTC). Os EGF- *like growth factors* (AREG, EREG e BTC) também chamados de mediadores intrafolículares da ovulação, são considerados os principais mediadores da ação do LH no folículo pré ovulatório (PARK et al., 2004; SHIMADA et al., 2006; ROMERO & SMITZ, 2010). Esses fatores de crescimento são inicialmente produzidos como pró-peptídeos, no entanto para que possam se ligar ao receptor de crescimento epidermal (EGFr) presentes principalmente nas células do cumulus e CsG, devem passar pela atividade proteolítica das enzimas ADAMs, das quais ADAM17 é considerada a de maior relevância (RICHARDS et al., 2002). A partir da ligação a seus receptores, os EGF- *like growth factors* estimulam o reinício da meiose, expansão das células do

cumulus e ovulação, além disso realizam a fosforilação das quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1 e ERK2) nas células do cumulus e granulosa, o qual assim como os EGF- *like growth factors* medeia muitos dos efeitos do LH (PARK et al., 2004; SHIMADA et al., 2006; ROMERO & SMITZ, 2010).

Dentre os hormônios relacionados com a reprodução, as prostaglandinas E2 (PGE2) e F2 (PGF2 $\alpha$ ) são extremamente relevantes para a ocorrência da ovulação. Esses hormônios são derivados do ácido araquidônico, sendo produzidas a partir da ação da ciclooxygenase 1 e 2 (COX 1 e COX 2). A COX 2 demonstra um aumento na sua concentração nas CsG em resposta ao pico de LH, no entanto este mesmo padrão não é observado para COX 1. Além disso, as PGE2 e PGF2 $\alpha$  demonstram-se abundantes no fluido folicular após o estímulo do LH. Essas prostaglandinas desempenham papel decisivo para ocorrência da ovulação, pois antes deste evento participam do aumento da vasodilatação tecidual e degradação da parede folicular pela ativação de proteinases (SIROIS et al., 2004). Fang et al (2013) evidenciaram em seu estudo com CsG de humanos que a partir do estímulo com LH os EGFr são ativados, com isso os EGF- *like growth factors* induzem o aumento de COX2 e consequentemente de PGE2, efeito esse dependente da ativação de ERK1 e 2.

Com base nessas informações, fica evidente que a ovulação de um folículo dominante após o parto depende do reestabelecimento da pulsatilidade de LH, que por sua vez está diretamente relacionado à habilidade dos folículos em produzir estradiol suficiente para desencadear a onda pré-ovulatória de LH. Além disso, segundo Butler (2003) a ovulação parece depender da disponibilidade de insulina e de IGF-1 que se encontram em baixa concentração durante distúrbios metabólicos como BEN.

Foi sugerido por BRITT (1992) que o ambiente bioquímico em que os folículos ovarianos se desenvolvem durante o período de crescimento folicular até a ovulação determina a saúde e a capacidade esteroidogênica dos mesmos. Além disso, atualmente sabe-se que o desenvolvimento folicular além de ser regulado por fatores endócrinos e locais, também pode ser afetado por mudanças metabólicas no sangue (VAN HOECK et al., 2014). Portanto, por ser caracterizado por intensas mudanças metabólicas o BEN pode ser considerado uma das principais desordens que afetam a fisiologia reprodutiva da fêmea bovina.

## 2.2 BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO (BEN) E MOBILIZAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DURANTE O BEN

O BEN tem início no período de transição, que compreende as 3 semanas que antecedem o parto e as 3 primeiras semanas pós-parto. Durante este período as fêmeas estão passando de um estado gestante e não lactante para estado de não gestante e lactante, o que implica em diversas alterações endócrinas, metabólicas, imunológicas e maior demanda energética para crescimento fetal final e produção de leite (GRUMMER, 1995; DRACKLEY, 1999). Este aumento na demanda energética não é compensado no início da lactação, pois concomitantemente a este evento a fêmea apresenta uma menor capacidade de consumo de matéria seca nos dias que antecedem o parto, com retorno lento na ingestão, que não acompanha as exigências da vaca (LEAN et al., 2013). Estes dois eventos caracterizam o BEN e podem ter efeito direto sobre a saúde dos animais e influenciar o reinício da atividade ovariana após o parto (DRACKLEY, 1999; GRUMMER, 1995; OSPINA et al., 2010).

Para atender à exigência fisiológica de aminoácidos, glicose, ácidos graxos e cálcio, o organismo passa por diversas adaptações, as quais envolvem principalmente o metabolismo da glicose e lipídeos. Essas alterações baseiam-se na economia da utilização de glicose por alguns tecidos e produção de energia a partir de novos compostos. Uma dessas alterações é a redução na produção de insulina pelo pâncreas (DRACKLEY; OVERTON; DOUGLAS, 2001), que resulta em redução no uso da glicose por órgãos sensíveis à insulina como tecido adiposo. Juntamente a isso, ocorre um estado transitório de resistência à insulina nos tecidos periféricos. Essas alterações têm por finalidade poupar a glicose circulante que se encontra em baixa concentração, para que esta seja utilizada pela glândula mamária na síntese de leite e colostro (HERDT, 2000).

Devido à alta demanda de glicose pela glândula mamária e baixa concentração de insulina no sangue, o organismo utiliza outros mecanismos para fornecer energia aos diversos tecidos sensíveis à insulina e dar maior suporte à produção leiteira. Esses mecanismos incluem a maior atividade das enzimas lipolíticas no tecido adiposo, maior expressão de genes associados à mobilização da gordura corporal e liberação de hormônio do crescimento (GH) pela hipófise (TANSEY et al., 2004; RONGE et al., 1988). No pós-parto inicial a fêmea bovina apresenta baixa expressão de receptores para GH no fígado, resultando na redução da produção de IGF-1 e

atuação expressiva do GH na mobilização do tecido adiposo (SUMNER & MCNAMARA, 2007). Como reportado em estudos, condições lipolíticas intensas durante a lactação têm sido associadas a distúrbios metabólicos e reprodutivos (ROCHE et al., 2006), os quais podem afetar a morfologia do COC, qualidade do óócito e do embrião (LEROY et al., 2005a; LEROY et al., 2012; JUNGHEIM et al., 2011; METWALLY et al., 2007) reduzindo drasticamente a proporção de embriões viáveis (LEROY et al., 2005b).

O tecido adiposo animal é constituído por células denominadas adipócitos, as quais são repletas de triglicerídeos. Os triglycerídeos são moléculas constituídas por três ácidos graxos de cadeia longa esterificados e uma molécula de glicerol. Quando o tecido adiposo é mobilizado para fornecer energia, as moléculas de triglycerídeos sofrem clivagem de suas ligações éster liberando NEFAs e glicerol. Este evento é denominado lipólise, tem como principal estimulador a hipoglicemia e é regulada pela ação das enzimas lipase hormônio-sensível, lipase de triacilglicerol e lipase de monoglycerídeo (HERDT, 2000; ARNER & LANGIN, 2014). Segundo Vanholder et al (2005) os NEFAs liberados neste processo atuam diretamente nas células foliculares, portanto o aumento na concentração deste metabólito no sangue e fluído folicular durante o período de transição, podem afetar o crescimento folicular.

Os NEFAs são definidos como ácidos graxos que não estão ligados a nenhuma fração lipídica presentes em fluidos biológicos (VAN HOECK et al., 2014). Essas moléculas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura química em ácidos graxos saturados e insaturados. Os ácidos graxos saturados possuem como característica a inexistência de ligações duplas entre seus pares de carbono, neste grupo estão incluídos o ácido palmítico (AP, C16:0) e esteárico (AS, C18:0). Por sua vez, os ácidos graxos insaturados podem ainda ser classificados em monoinsaturados (MUFAs) ou poli-insaturados (PUFAs) de acordo com o número de insaturações existentes entre os seus pares de carbono. Os ácidos graxos insaturados possuem apenas uma ligação dupla entre seus pares de carbonos, sendo um dos principais representantes deste grupo o ácido oleico (AO, C18:1). Durante o BEN os ácidos graxos supracitados encontram-se em alta concentração no sangue.

Os NEFAs liberados durante a lipólise ficam disponíveis como fonte de energia para a maioria dos tecidos corporais. Durante o BEN, a modulação da concentração deste metabólito no sangue assim como a regulação na sua distribuição é realizada pelo fígado, o qual atua removendo parte deste metabólito (HERDT, 2000). Após

serem absorvidos pelo fígado os NEFAs podem ser oxidados para produção de energia, incompletamente oxidados a corpos cetônicos, esterificados com o glicerol e armazenados como triglicerídeos ou exportados como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (DRACKLEY & ANDERSEN, 2006). A via mais importante neste ciclo para produção de energia é a oxidação dos NEFAs a acetil-CoA, pois, esta última pode ser utilizada pelo ciclo de Krebs para produção de energia. No entanto, o uso de Acetil-CoA pelo ciclo de Krebs é regulado pela síntese de oxaloacetato produzido a partir de precursores glicídicos, o que torna esta via dependente de uma concentração adequada de glicose (DRACKLEY, 1999; BOBE; YOUNG; BEITZ, 2004; SORDILLO & RAPHAEL, 2013). Portanto, altos níveis de NEFAs associados a baixa concentração de glicose e oxalacetato impedem a oxidação completa das moléculas de acetil-CoA (BELL, 1995). O acúmulo de acetil-CoA é convertido em corpos cetônicos (acetoacetato,  $\beta$ -hidroxibutirato e acetona) ou pode ser substrato para a síntese de acetato (MULLIGAN & DOHERTY, 2008).

O transporte desses ácidos graxos no sangue é realizado pela albumina, em contrapartida o transporte para os tecidos é realizado por um grupo de proteínas transportadoras de ácidos graxos conhecidas como família carreadora de soluto 27 (SLC27) ou proteína carreadora de ácidos graxos (FATP). A primeira isoforma identificada desta família foi o gene SLC27A1 (SCHAFFER & LODISH, 1994) o qual é expresso em vários tecidos incluindo as CsG bovina (YENUGANTI et al., 2016). Segundo WU et al. (2006), SCL27A1 está diretamente envolvido com a captação de ácidos graxos e a captação dos ácidos graxos regulada pela insulina ocorre via SLC27A1 em camundongos. YENUGANTI et al. (2016) demonstrou em seu estudo que existe relação entre os NEFAs e os genes relacionados ao metabolismo lipídico nas CsG bovina, pois o tratamento das células com AO aumentou a expressão de SLC27A1.

### 2.3 ÁCIDOS GRAXOS NÃO ESTERIFICADOS (NEFAS) NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E OVULAÇÃO

O primeiro relato do efeito tóxico do aumento da concentração dos NEFAs no ovário foi realizado por KRUIP & KEMP (1999), após isso numerosos estudos vêm relatando os impactos diretos dos NEFAs sobre as CsG, células da teca e CCO e suas funções. Em relação às CsG, estudos em bovinos confirmaram que concentrações

elevadas de NEFAs prejudicam a viabilidade e capacidade esteroidogênica dessas células (VANHOLDER et al., 2005; WANG et al., 2020). Além disso, Scsukova et al. (2000) demonstrou que em fêmeas suínas, estas células podem ter seus receptores de LH desestabilizados pela ação de NEFAs e consequentemente a responsividade ao LH é inibida.

Nas células da teca, o uso *in vitro* de uma mistura dos AO, AS e AP resultou na inibição da proliferação destas células e produção reduzida de progesterona (VANHOLDER et al., 2006). A inibição da proliferação celular associadas aos níveis sistêmicos reduzidos de IGF-I, insulina e glicose característicos do BEN podem comprometer o crescimento folicular (GRIMARD et al., 1995). Ainda, o aumento da concentração plasmática de NEFAs já foi correlacionado com um atraso à primeira ovulação no pós-parto (GIULIODORI et al., 2011). Os NEFAs interferem na regulação do crescimento celular, diferenciação e apoptose podendo desta forma estar envolvidos na formação de cistos foliculares (CASTRO et al., 2012; PETER, 2004).

Os efeitos dos NEFAs sobre as células do cumulus foram reportados por Leroy et al. (2005a), o qual constatou que a exposição de culturas destas células *in vitro* a altas concentrações de NEFAs resultou no aumento das taxas de apoptose celular. As células do cumulus são consideradas uma barreira entre o óvulo e fluido folicular, pois atuam regulando a transferência de pequenas moléculas para o óvulo, entre elas os ácidos graxos (COLLADO et al., 2017). Esta regulação da exposição do óvulo aos NEFAs é importante para o desenvolvimento da competência oocitária e fisiologia embrionária inicial. O íntimo relacionamento existente entre essas estruturas torna o óvulo dependente das células do cumulus (THIBAULT; SZOLLOSI; GÉRARD, 1987). O impacto negativo desta relação é que as alterações metabólicas que afetam a composição do fluido folicular e viabilidade das células foliculares, pode influenciar o potencial de desenvolvimento do óvulo e ainda sobrevivência do embrião (SCARAMUZZI et al., 2011).

Estudos realizados já revelaram que óvulos que se desenvolvem no interior de folículos com padrão de crescimento alterado possuem qualidade reduzida (LEQUARRE et al., 2005). Van Hoeck et al. (2011) utilizando um modelo bovino de maturação *in vitro*, relataram que a maturação final do óvulo em ambiente com alta concentração de NEFAs (25 $\mu$ M AS, 50 $\mu$ M AP e 75 $\mu$ M de AO) resultou na redução do número de células nos blastocistos e aumento na proporção de células apoptóticas.

Além disso, Ferst et al. (2020) concluíram em seu estudo que a administração intrafolicular de NEFAs resulta em atraso no desenvolvimento do folículo dominante.

Todas as alterações citadas podem acarretar prejuízos na fertilidade dos animais, pois o sucesso reprodutivo depende de uma série de eventos fisiológicos que precisam ocorrer de forma coordenada. Desta forma, a elevação desses ácidos graxos no período do BEN é um fator chave para que ocorra a diminuição da fertilidade dos animais no período do pós-parto (FERST et al., 2020).

O AP é o segundo ácido graxo mais abundante na circulação (~25%) e proporções semelhantes são encontradas no fluido folicular (LEROY et al., 2004, 2005a). Está comprovado que este ácido graxo tem efeito tóxico em células pancreáticas e hepáticas (LIU et al., 2017; XIAO et al., 2017), assim como em CsG de ratos e suínos (CHEN et al., 2019; SHIBAHARA et al., 2020). Nesses últimos dois estudos em que as avaliações buscaram os efeitos do AP sobre células foliculares, Chen et al. (2019) utilizou concentrações entre 100-800 $\mu$ M, os efeitos verificados foram de redução da viabilidade e função das CsG a partir de 200 $\mu$ M e 400 $\mu$ M, respectivamente. Por sua vez Shibahara et al. (2020) constatou redução da proliferação e viabilidade dessas células após a exposição das mesmas a concentração de 0,5mM de AP. Resultados obtidos por Vanholder et al. (2005) sugerem que o AP é o NEFA que apresenta efeito inibitório mais significativo sobre a proliferação de CsG bovina *in vitro*, além de reduzir o número de células na mesma extensão independente da concentração utilizada (150 $\mu$ M, 300 $\mu$ M e 500 $\mu$ M). Além disso, Ferst et al. (2021) relataram um aumento da metilação na lisina 9 da histona H3 (H3K9me3) em células endometriais tratadas com 150 $\mu$ M AP, sugerindo um efeito epigenético do AP na inibição de alguns genes. Portanto este achado sugere que o AP pode estar relacionado com a redução na expressão de genes que controlam diferentes vias celulares.

Diante dos estudos citados, torna-se evidente que elevadas concentrações de AP possuem um intenso efeito tóxico sobre diferentes tipos celulares, desta forma esse NEFAs pode afetar estruturas que constituem os ovários e auxiliar na redução da eficiência reprodutiva de vacas de leite no pós-parto. Porém, até o momento não se tem estudos publicados que comprovem os efeitos isolados do AP sobre o crescimento folicular e a ovulação de fêmeas bovinas, o que torna notória a necessidade de estudos acerca dos efeitos desse ácido graxo sobre esses eventos.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Os animais foram pré-sincronizados com protocolo hormonal e no dia 7, vacas com diâmetro folicular entre 9 e 12mm foram aleatoriamente distribuídas para receber uma injeção intrafolicular de solução fisiológica (Grupo Controle) ou 150 $\mu$ M de ácido palmítico (Grupo Palmítico). O diâmetro folicular foi monitorado diariamente até atresia ou ovulação do folículo injetado.

#### 3.2 MANIPULAÇÃO DO CICLO ESTRAL

A emergência de uma nova onda folicular foi induzida usando dispositivo intravaginal liberador de progesterona (DIV, Agener União Saúde Animal, São Paulo, Brasil; 1 g de progesterona), associado à injeção intramuscular (IM) de 1 ml de lecirelina (TEC-Relin, Agener União, Brasil). O tratamento com progesterona foi removido no dia cinco do protocolo, no momento da retirada do DIV, um análogo da prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ; 500  $\mu$ g cloprostenol, Estron, Agener União Saúde Animal, São Paulo, Brasil) foi administrado por via intramuscular. Dois dias após a remoção do implante de p4 foram realizadas as injeções intrafoliculares de AP (grupo tratamento) e solução fisiológica (grupo controle). O diâmetro folicular foi avaliado através de ultrassonografia no dia oito do protocolo, neste mesmo dia todos os animais receberam 1 ml de lecirelina (TEC-Relin, Agener União Saúde Animal, Brasil) por via intramuscular.

#### 3.3 PREPARAÇÃO DO AP E INJEÇÃO INTRAFOLICULAR

O AP (10006627) utilizado foi adquirido de Cayman (Ann Arbor, Michigan, EUA), inicialmente essa substância foi dissolvida em etanol de acordo com sua solubilidade e posteriormente diluída em solução fisiológica. A concentração final para injeção intrafolicular consistiu em 150  $\mu$ M de AP diluído em solução fisiológica com 0,5% de etanol. O grupo controle foi tratado apenas com veículo que consistia em solução fisiológica com 0,5% de etanol. A concentração de AP usada neste estudo é representativa da concentração circulante em vacas no início do pós-parto (LEROY et al., 2005a; VAN HOECK et al., 2013).

As injeções intrafolículares foram realizadas usando um sistema aquecido com duas agulhas estéreis guiadas por ultrassom equipado com sonda vaginal de 7,5 MHz. Antes da injeção, o sistema de agulha interna foi lavado consecutivamente com álcool 70% e solução salina (NaCl 0,9%) e, em seguida, preenchido com soluções de tratamento. Após anestesia peridural, foi realizada injeção intrafolícular empurrando a agulha externa até perto de atingir o folículo. A agulha interna foi empurrada até que o bisel aparecesse dentro do folículo na imagem de ultrasom e os tratamentos foram aplicados imediatamente. O turbilhão do fluido que entra no folículo foi monitorado como um indicador de que a injeção foi bem sucedida. O volume de fluido folicular foi estimado usando a equação de regressão linear  $FolV = -685,1 + 120.7D$ , onde  $FolV$  corresponde ao volume folicular estimado e  $D$  ao diâmetro do folículo a ser injetado (FERREIRA et al., 2007).

### 3.4 ULTRASSONOGRAFIA

Um ultrasom modo B linear multifrequência (Sonoscape A5 Vet) foi usado para a varredura transretal. Ambos os ovários foram examinados pelo mesmo operador durante todo o exame de todos os animais. Todos os folículos maiores que 5 mm foram plotados usando três a cinco fatias virtuais do ovário, permitindo a localização tridimensional dos folículos e o monitoramento dos folículos individuais durante a onda folicular. A varredura de ultrassom em modo B foi realizada 36 horas após a administração do análogo do GnRH para determinar a ocorrência de atresia ou ovulação do maior diâmetro folicular.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

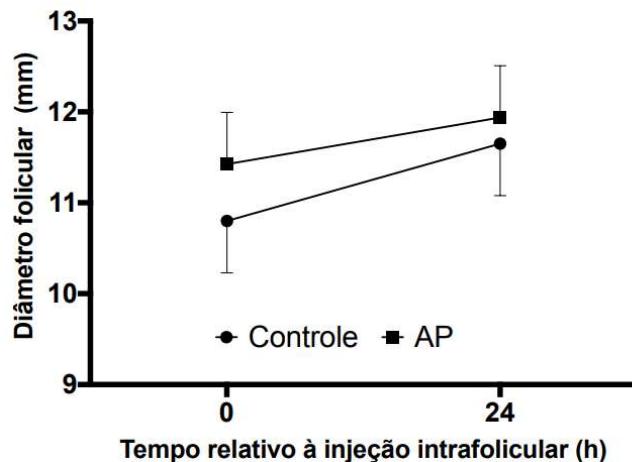
O efeito dos tratamentos sobre o crescimento folicular foi analisado utilizando modelos mistos para dados repetidos. Foi determinado o efeito de tratamento, tempo e sua interação. Diferentes estruturas de covariância foram testadas para cada modelo e foi utilizado aquela que apresentou um menor critério de informação de Akaike (AIC). Todas as variáveis contínuas assim como os resíduos de cada modelo estatístico foram testadas para normalidade com a utilização do teste de Shapiro-Wilk.

O efeito dos tratamentos sobre a taxa de ovulação foi avaliado por regressão logística. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC) e foi adotado como nível de significância  $P < 0,05$ .

#### 4 RESULTADOS

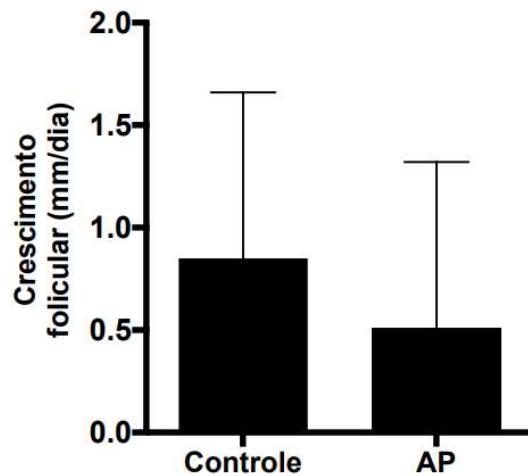
Em ambos os grupos, controle ( $n=4$ ) e tratamento ( $n=4$ ) observou-se continuidade no crescimento folicular 24 h após a realização das injeções. Os diâmetros médios foram de  $10,8 \pm 1,0$  e  $11,6$  mm, em 0 e 24h após as injeções no grupo controle e  $11,4 \pm 0,6$  e  $11,9$  mm, em 0 e 24h, no grupo tratamento (Figura 1). Além disso, a taxa de crescimento folicular não diferiu entre os grupos controle (0,8) e tratamento (0,5) (Figura 2). Foi observada uma redução de 50% na taxa de ovulação dos folículos que receberam AP (1/4; 25%) em comparação ao grupo controle (3/4; 75%) (Figura 3).

*Figura 1 - Efeito da injeção intrafolicular de ácido palmítico (AP) no diâmetro folicular. O desenvolvimento de uma nova onda folicular foi induzido e posteriormente foram realizadas injeções intrafoliculares de 150 µM de AP ( $n = 4$ ) ou veículo (solução fisiológica;  $n = 4$ ) no folículo dominante de cada vaca quando atingiram entre 10 e 12 mm de diâmetro; os diâmetros foliculares foram monitorados através de exames ultrassonográficos 24 horas após as injeções.*



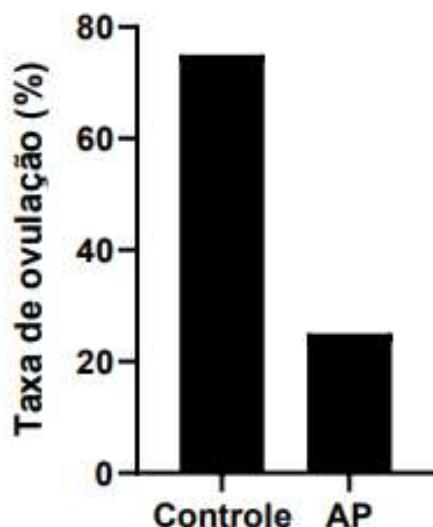
Fonte: Agostini et al., 2022.

*Figura 2 - Efeito da injeção intrafolicular de ácido palmítico (AP) na taxa de crescimento folicular. O desenvolvimento de uma nova onda folicular foi induzido e posteriormente foram realizadas injeções intrafoliculares de 150 µM de AP ( $n = 4$ ) ou veículo (solução fisiológica;  $n = 4$ ) no folículo dominante de cada vaca quando atingiram entre 10 e 12 mm de diâmetro.*



Fonte: Agostini et al., 2022.

*Figura 3 - Efeito da injeção intrafolicular de ácido palmítico (AP) na taxa de ovulação. O desenvolvimento de uma nova onda folicular foi induzido e posteriormente foram realizadas injeções intrafoliculares de 150 µM de AP ( $n = 4$ ) ou veículo (solução fisiológica;  $n = 4$ ) no folículo dominante de cada vaca quando atingiram entre 10 e 12 mm de diâmetro; a determinação da ovulação foi realizada através de exames ultrassonográficos 36 horas após a administração de lecirelina.*



Fonte: Agostini et al., 2022.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos, pela primeira vez, que o aumento intrafolicular de ácido palmítico em vacas que não estão em BEN, não interfere no crescimento folicular. No entanto, os dados sugerem um efeito no mecanismo de ovulação. Foi utilizado um modelo controlado e muito bem aceito para modificação do ambiente folicular. O efeito dos NEFAs sobre o crescimento do folículo dominante previamente reportado (VANHOLDER et al., 2005; WANG et al., 2020; FERST et al., 2020) pode estar relacionado com uma ação indireta dos NEFAs ou interação do AP com outros ácidos graxos.

Bovinos leiteiros em estado de BEN apresentam elevação na concentração de NEFAs e  $\beta$ -hidroxibutirato no sangue e fluído folicular (DRACKLEY & CARDOSO, 2014; LEROY et al., 2005a). Além disso, há evidências de que essa elevação na concentração de NEFAs compromete a proliferação e capacidade esteroidogênica das CsG, além de gerar atraso no desenvolvimento do folículo dominante (VANHOLDER et al., 2005; WANG et al., 2020; FERST et al., 2020). Esses efeitos da exposição do folículo ovariano a elevadas concentrações de NEFAs pode estar correlacionado ao atraso a primeira ovulação pós-parto e redução na fertilidade de fêmeas em BEN. No entanto, durante o estado de BEN não é possível determinar quais efeitos resultam da ação dos NEFAs, além de ser impossível distinguir os efeitos isolados desses ácidos graxos, fato que dificulta as investigações em animais em BEN. Este estudo aplicou injeção intrafolicular em vacas que não estavam em BEN para avaliar os efeitos locais do AP no crescimento folicular e ovulação de fêmeas bovinas.

Em um estudo *in vitro* desenvolvido por Chen et al. (2019) foi possível observar que o AP reduziu a viabilidade e função das CsG de ratos, esses efeitos foram observados a partir da concentração de 200 $\mu$ M e 400 $\mu$ M, respectivamente. Além disso, Shibahara et al. (2020) relataram redução na proliferação e viabilidade das CsG de suínos, expostas a concentração de 0,5mM de AP e Vanholder et al. (2005) sugeriram a partir de seus experimentos que o AP é o NEFA que apresenta efeito inibitório mais significativo sobre a proliferação de CsG bovina *in vitro*, além de reduzir o número de células na mesma extensão independente da concentração a que são expostas (150 $\mu$ M, 300 $\mu$ M e 500 $\mu$ M). Esses efeitos sobre as CsG poderiam estar relacionados a um atraso no crescimento folicular e subsequente ovulação. No

entanto, até onde sabemos, não há resultados de estudos relatando os efeitos do aumento da concentração intrafolicular desse ácido graxo sobre o crescimento folicular e ovulação. Descobertas deste estudo revelaram que o aumento da concentração de AP no fluido folicular não resulta em atraso no crescimento normal de folículos dominantes saudáveis, assim como não reduz suas taxas de crescimento. De acordo com Drackley & Cardoso (2014) vacas que se encontram em BEN são expostas aos NEFAs por semanas após o parto, além disso segundo VALCKX et al (2014) a exposição dos folículos aos NEFAs durante o período de crescimento é mais prejudicial do que a exposição apenas durante a fase final de maturação, portanto a ausência de alterações no crescimento folicular relatada no presente estudo pode estar relacionada ao curto período de exposição dos folículos ao AP.

A concentração de AP usada neste estudo foi definida a partir dos resultados relatados por Leroy et al., 2005a & Van Hoeck et al., 2013, os quais demonstraram que vacas no início do pós-parto possuem concentração circulante de AP em torno de 150 $\mu$ M. Concentrações mais elevadas de AP ou períodos de exposição mais prolongados a esse NEFA poderiam ser testados, no entanto o modelo de IIF utilizado no presente estudo possui limitação quanto esses pontos. Essas limitações se devem respectivamente, a dificuldade de diluição do AP e possibilidade de interferência do número de injeções sobre o crescimento folicular.

A ocorrência da ovulação depende da atividade esteroidogênica das células foliculares, pois é a partir do aumento da produção de estrógeno que tem-se um pico de LH responsável pela expressão de uma série de genes envolvidos na ovulação (RICHARDS, 2002; SCHUERMANN, et al., 2018) além disso, atualmente sabe-se que os NEFAs afetam a função, viabilidade e atividade esteroidogênica das células da granulosa (JORRITSMA et al., 2004; VANHOLDER et al., 2005; WANG et al., 2020). Com base nessas informações, uma possível explicação para a tendência na redução das taxas ovulatórias observada no presente estudo é de que o AP reduz a abundância de mRNA de genes que codificam proteínas responsáveis pelo controle da síntese de esteroides (CYP19A1, CYP17A1, CYP11A1, 3 $\beta$ -HSD, e StAR) e ovulação (AREG, EREG e BTC).

O presente estudo relatou pela primeira vez os efeitos isolados do AP *in vivo*, no entanto resta determinar através de estudos futuros se uma exposição prolongada a concentrações intrafoliculares aumentadas de AP afetam o crescimento folicular,

bem como quais os mecanismos do processo ovulatório são afetados por esse ácido graxo.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que concentrações intrafoliculares aumentadas de AP em vacas que não estão em estado BEN não reduzem o crescimento folicular. No entanto, os dados sugerem uma redução na taxa ovulatória.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.; GINTHER, O.J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, n.1, p.177-88, 1992.
- ARNER, P.; LANGIN, D. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, p. 255-262, 2014.
- BEG, M. A.; MEIRA, C.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Role of oestradiol in growth of follicles and follicle deviation in heifers. **Reproduction**, v.125, n.6, p.847-54, 2003.
- BEG, M. A.; O. J. GINTHER. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. **Reproduction**, v.132, n.3, p.365-77, 2006.
- BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to Regulation of Organic Nutrient Late Pregnancy Metabolism During Transition from to Early. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2804-2819, 1995.
- BOBE, G.; YOUNG, J.W.; BEITZ, D.C. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.3105-24, 2004.
- BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; CARVALHO, G. R.; FONSECA, J. F.; MARCATTI NETO, A.; ASSIS, A. J. Características da dinâmica folicular e regressão luteal de vacas das raças Gir e Nelore após tratamento com cloprostenol sódico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.85-92, 2003.
- BRITT, J. H. Impacts of Early Postpartum Metabolism on Follicular Development and Fertility. **Bovine Proc.**, v.24, p.39-43, 1992.
- BUTLER, W.R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 83, p. 211-218, 2003.
- BUTLER, W.R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 449–457, 2000.
- CASTRO, N.; KAWASHIMA, C.; VAN DORLAND, H.A.; MOREL, I.; MIYAMOTO, A.; BRUCKMAIER, R.M. Metabolic and energy status during the dry period is crucial for the resumption of ovarian activity postpartum in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 5804–12, 2012.
- CHEN, Y.; KINNEY, L.; SOLDIN, S.J. Performance evaluation of Siemens ADVIA Centaur enhanced estradiol assay and a split sample comparison with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Clinical Biochem**, v. 45, p. 811–815, 2012.

CHEN, Z.; LEI, L.; WEN, D.; YANG, L. Melatonin attenuates palmitic acid-induced mouse granulosa cells apoptosis via endoplasmic reticulum stress. **Journal of Ovarian Research**, 12(1):43, 2019.

COLLADO, M.D.; SILVEIRA, J.C.; SANGALLI, J.R.; ANDRADE, G.M.; SOUSA, L.R.S; SILVA, L.A.; MEIRELLES, F.V.; PERECIN, F. Fatty Acid Binding Protein 3 And Transzonal Projections Are Involved In Lipid Accumulation During *In Vitro* Maturation Of Bovine Oocytes. **Scientific Reports**, 7: 2645, 2017.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: a review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, p. 223–229, 2013.

DRACKLEY, J.K. ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2259– 2273, 1999.

DRACKLEY, J.K.; ANDERSEN, J.B. Splanchnic metabolism of long-chain fatty acids in ruminants. In: Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on gene expression, immunology and stress. **Wegeningen Academic Publishers**, p. 199-224, 2006.

DRACKLEY, J.K.; CARDOSO, F.C. Prepartum and postpartum nutritional management to optimize fertility in high-yielding dairy cows in confined TMR systems. **Animal**, v.1, p. 5–14, 2014.

DRACKLEY, J.K.; OERTON, T.R.; DOUGLAS, G.N. Adaptations of Glucose and Long-Chain Fatty Acid Metabolism in Liver of Dairy Cows during the Periparturient Period. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. E100-E112, 2001.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v.55, n.6, p.1211-39, 2001.

DRION, P.V.; BECKERS, J.F.; DERKENNE, F.; HANZEN, C.H. Le développement folliculaire chez la vache. 2. Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du postpartum. **Annales Médecine Vétérinaire**, v.144, p. 385-404, 2000.

DROST, M.; SAVIO, J.D.; BARROS, C.M.; BADINGA, L.; THATCHER, W.W. Ovariectomy by colpotomy in cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, p. 337–339, 1992.

DUPONT, J.; SCARAMUZZIL, R.J.; REVERCHON, M. The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants. **Animal**, v. 8, p. 1031-1044, 2014.

ESPEY, L.L. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 232-238, 1994.

FANG, L.; CHENG, J.; CHANG, H.; SUN, Y.; LEUNG, P.C.K. EGF-like growth factors induce COX-2-derived PGE2 production through ERK1/2 in human granulosa cells. **J Clin Endocrinol Metab**, v.98, n.12, p.4932-41. 2013.

FERREIRA, A. M. Reprodução da Fêmea Bovina: Fisiologia Aplicada e Problemas mais comuns (causas e tratamentos). Juiz do Fora: Editar, 2010. p. 247.

FERREIRA, R.; OLIVEIRA, J.F.; FERNANDES, R.; MORAES, J.F.; GONCALVES, P.B. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**. 134:713-9, 2007.

FERST, J.G.; GLANZNER, W.G.; GUTIERREZ, K.; MACEDO, M.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B.G.; DUGGAVATHI, R.; GONÇALVES, P.B.D.; BORDIGNON, V. Supplementation of oleic acid, stearic acid, palmitic acid and  $\beta$ -hydroxybutyrate increase H3K9me3 in endometrial epithelial cells of cattle cultured in vitro. **Anim. Reprod. Sci.** v. 233, 2021.

FERST, J.G.; MISSIO, D.; BERTOLIN, K.; GASPERIN, B.G.; LEIVAS, F.G.; BORDIGNON, V.; GONÇALVES, P.B.; FERREIRA, R. Intrafollicular injection of nonesterified fatty acids impaired dominant follicle growth in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 219, 2020.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.O.; TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.65, n.3, p.648-54, 2001.

GARVERICK, H.A.; HARRIS, M.N.; VOGEL-BLUEL, R.; SAMPSON, J.D.; BADER, J.; LAMBERSON, W.R.; SPAIN, J.N.; LUCY, M.C.; YOUNGQUIST, R.S. Concentrations of nonesterified fatty acids and glucose in blood of periparturient dairy cows are indicative of pregnancy success at first insemination. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.181-188, 2013.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A.; KOT, K. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Reproduction**, v.124, n.4, p.475-82, 2002.

GIULIODORI, M.J.; DELAVAUD, C.; CHILLIARD, Y.; BECÚ-VILLALOBOS, D.; LACAU-MENGIDO, I.; DE LA SOTA, R.L. High NEFA concentrations around parturition are associated with delayed ovulations in grazing dairy cows. **Livestock Science**, V. 141, P 123-128, 2011.

GRIMARD, B.; HUMBLOT, P.; THIBIER, M. Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and estradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. **Journal Reproduction and Fertility**, v.104, p.173-179, 1995.

GRUMMER, R.R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2820–2833, 1995.

HANZEN, C.H.; LOURTIE, O.; DRION, P.V. Follicular development in the cow. I. Morphological aspects and dynamic growth pattern. **Annales Médecine Vétérinaire**, v. 144, p. 223-235, 2000.

HERDT, T.H. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**, v. 16, p. 215–230, 2000.

- JORRITSMA, R.; CÉSAR, M.L.; HERMANS, J.T.; KRUITWAGEN, C.L.; VOS, P.L.; KRUIP, T.A. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 225–235, 2004.
- JUNGHEIM, E.S.; LOUDEN, E.D.; CHI, M.M.; FROLOVA, A.I.; RILEY, J.K.; MOLEY, K.H. Preimplantation exposure of mouse embryos to palmitic acid results in fetal growth restriction followed by catch-up growth in the offspring. **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 678–683, 2011.
- KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, p.191-206, 2006.
- KRUIP, T. A.; B. KEMP. Nutrition and fertility in agricultural domestic animals. **Tijdschr Diergeneesk**, v.124, n.16, p.462-7, 1999.
- LEAN, I.J.; SAUN, R.V.; DEGARIS, P.J. Energy and protein nutrition management of transition dairy cows. The Veterinary Clinics North America. **Food Animal Practice**, v. 29, p. 337-366, 2013.
- LEQUARRE, A.S.; VIGNERON, C.; RIBAUCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIESTRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, v. 63, p. 841–859, 2005.
- LEROY, J.L.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B.; CHRISTOPHE, A.; OPSOMER, G.; DE KUIF, A.; GENICOT, G.; VAN SOOM, A. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. **Reproduction**, v. 130, p. 485-495, 2005a.
- LEROY, J.L.; VANHOLDER, T.; VAN KNEGSEL, A.T.; GARCIA-ISPIERTO, I.; BOLS, P.E. Nutrient prioritization in dairy cows early postpartum: mismatch between metabolism and fertility? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43 (Suppl. 2), p. 96–103, 2008.
- LEROY, J.L.M.R.; OPSOMER, G.; DE VLIEGHER, S.; VANHOLDER, T.; GOOSSENS, L.; GELDHOF, A.; BOLS, P.E.J.; DE KUIF, A.; VAN SOOM, A. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. **Theriogenology**, v. 64, p. 2022–2036, 2005b.
- LEROY, J.L.M.R.; RIZOS, D.; STURMEY, R.G.S.; BOSSAERT, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; VAN HOECK, V.; VALCKX, S.; BOLS, P.E. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolic disorders and oocyte quality: a focus on dairy cow fertility. **Reproduction Fertility and Development**, v. 24, p. 1–12, 2012.
- LI, J.; MAO, Y.S.; CHEN, F.; XIA, D.X.; ZHAO, T.Q. Palmitic acid up regulates Gal-3 and induces insulin resistance in macrophages by mediating the balance between KLF4 and NF- $\kappa$ B. **Exp. Ther. Med**, v.22, 2021.
- LIU, C.; FU, Y.; LI, C.E.; CHEN, T.; LI, X. Phycocyanin-functionalized selenium nanoparticles reverse palmitic acid-induced pancreatic beta cell apoptosis by enhancing cellular uptake and blocking reactive oxygen species (ROS)-mediated

- mitochondria dysfunction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 65(22):4405–13, 2017.
- LIU, Z.; SHIMADA, M.; RICHARDS, J.S. The involvement of the Toll-like receptor family in ovulation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.25, p. 223-228, 2008.
- METWALLY, M.; CITTING, R.; TIPTON, A.; SKULL, J.; LEDGER, W.L. Effect of increased body mass index on oocyte and embryo quality in IVF patients. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 15, p. 532–538, 2007.
- MIHM, M.; CROWE, M.A.; KNIGHT, P.G.; AUSTIN, E.J. Follicle wave growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, n.4, p.191- 200, 2002.
- MULLIGAN, F. J.; M. L. DOHERTY. Production diseases of the transition cow. **The Veterinary Journal**, v.176, n.1, p.3-9, 2008.
- OSPINAS, P.A.; NYDAM, D.V.; STOKOL, T.; OVERTON, T.R. Associations of elevated nonesterified fatty acids and b-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p.1596–603, 2010.
- PARK, J. Y.; SU, Y.Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S.L.C.; CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v.303, n.5658, p.682-4, 2004.
- PEDROZA, G.H.; LANZON, L.F.; RABAGLINO, M.B.; WALKER, W.L.; VAHMANI, P.; DENICOL, A.C. Exposure to non-esterified fatty acids in vitro results in changes in the ovarian and follicular environment in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.238, 2022.
- PETER, A. T. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, n.1, p.1-7, 2004.
- PFAFFLL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, 29, e45, 2001.
- PICTON, A.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v. 55, p. 1193-1210, 2001.
- PUGLIESI, G., REZENDE, R., SILVA, J., LOPES, E., NISHIMURA, T., BARUSELLI, P., BINELLI, M. Use of Doppler ultrasonography in timed-AI and ET programs in cattle. **Revista Brasileira De Reprodução Animal**, v. 41, p.140–150, 2017.
- RICHARDS, J. S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiological Reviews**, v.60, n.1, p.51-89, 1980.
- RICHARDS, J.S.; RUSSEL, D.L.; OCHSNER, S. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. **Annual Review of Physiology**, v. 64, p. 69-92, 2002.

- RIVERA, G. M.; J. E. FORTUNE. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. **Endocrinology**, v.144, n.2, p.437-46, 2003.
- ROBERT, C.; GAGNÉ, D.; LUSSIER, J.G.; BOUSQUET, D.; BARNES, F.L.; SIRARD, M.A. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. **Reproduction**, v.125, n.3, p.437- 46, 2003.
- ROCHE, J. R.; BERRY, D.P.; KOLVER, E.S. Holstein-Friesian strain and feed effects on milk production, body weight, and body condition score profiles in grazing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3532-43, 2006.
- ROMERO, S.; SMITZ, J. Improvement of in vitro culture of mouse cumulus-oocyte complexes using PDE3-inhibitor followed by meiosis induction with epiregulin. **Fertility and Sterility**, v.93, n.3, p.936-44, 2010.
- RONGE, H.; BLUM, J.; CLEMENT, C.; JANS, F.; LEUENBERGER, H.; BINDER, H. Somatomedin C in dairy cows related to energy and protein supply and to milk production. **Animal Production Science**, v. 47, p. 165–183, 1988.
- ROVANI, M.T.; GASPERIN, B.G.; FERREIRA, R.; DUGGAVATHI, R.; BORDIGNON, V.; GONÇALVES, P.B.D. Methods to study ovarian function in monovulatory species using the cow as a model. **Anim. Reprod.** v. 14, n. 2, p. 383-391, 2017.
- SCARAMUZZI, R.J.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; DRIANCOURT, M-A.; DUPONT, J.; FORTUNE, J.E.; GILCHRIST, R.B.; MARTIN, G.B.; MCNATTYL, K.P.; MCNEILLY, A.S.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; VINONÔLES, C.; WEBB, R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reproduction Nutrition Development**, v. 23, p. 444–467, 2011.
- SCHAFFER, J. E.; H. F. LODISH. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. **Cell**, v.79, n.3, p.427-36, 1994.
- SCHUERMANN, Y.; ROVANI, M.T.; GASPERIN, B.; FERREIRA, R.; FERST, J.; MADOGWE, E.; GONÇALVES, P.B.; BORDIGNON, V.; DUGGAVATHI, R. ERK1/2-dependent gene expression in the bovine ovulating follicle. **Science report**, 8(1):16170, 2018.
- SCSUKOVA, S.; JEZOVÁ, M.; VRANOVÁ, J.; KOLENA, J. Involvement of membrane surface charge in thermal stability of the rat ovarian LH/hCG receptor. **Biochim Biophys Acta**, v.1468, n.1-2, p.15-9, 2000.
- SHIBAHARA, H.; ISHIGURO, A.; INOUE, Y.; KOUMEI, S.; KUWAYAMA, T.; IWATA, H. Mechanism of palmitic acid-induced deterioration of *in vitro* development of porcine oocytes and granulosa cells. **Theriogenology**, v. 141, p. 54-61, 2020.
- SHIMADA, M.; HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; RICHARDS, J.S. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin

synthase 2 and progesterone receptor. **Molecular Endocrinology**, v.20, n.6, p.1352-65, 2006.

SHOHAM, Z.; SCHACHTER, M.; LOUMAYE, E.; WEISSMAN, A.; MACNAMEE, M.; INSLER, V. The luteinizing hormone surge-the final stage in ovulation induction: modern aspects of ovulation triggering. **Fertility and sterility**, v. 64, p. 237-251, 1995.

SIDDQUI, M.A.R.; GINTHER, O.J. Switching of largest follicle from dominant to subordinate status when follicle and CL are in same ovary in heifers. **Theriogenology**, v.82, n.2, p.259–265, 2014.

SIROIS, J.; J. E. FORTUNE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v.39, n.2, p.308-17, 1988.

SIROIS, J.; SAYASITH, K.; BROWN, K.A.; STOCK, A.E.; BOUCHARD, N.; DORÉ, M. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. **Human Reproduction Update**, v.10, n.5, p.373-85, 2004.

SMITH, M.C.A.; WALLACE, J.M. Influence of early postpartum ovarian activity on the re-establishment of pregnancy in multiparous and primiparous dairy cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v. 10, p. 207–216, 1998.

SORDILLO, L. M.; W. RAPHAEL. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v.29, p.267-278, 2013.

SUMNER, J. S.; MCNAMARA, J.P. Expression of key genes controlling lipolysis in adipose tissue of Holstein dairy cattle during the dry period and lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 5237-5246, 2007.

TANSEY, J.T.; SZTALRYD, C.; HLAVIN, E.M.; KIMMEL, A.R.; LONDOS, C. The central role of perilipin A in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. **Life**, v. 56, p. 379–385, 2004.

THIBAULT, C.; SZOLLOSI, D.; GÉRARD, M. Mammalian oocyte maturation. **Reproduction Nutrition Development**, v. 27, p. 865–896, 1987.

VALCKX, S.D.; VAN HOECK, V.; ARIAS-ALVAREZ, M.; MAILLO, V.; LOPEZ-CARDONA, A.P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; BERTH, M.; CORTVRINDT, R.; BOLS, P.E.J.; LEROY, J.L.M.R. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during in vitro murine follicle growth alter follicular physiology and reduce oocyte developmental competence. **Fertil Steril**, v.102, p. 1769-76, 2014.

VAN HOECK, V.; BOLS, P.E.J.; BINELLI, M.; LEROY, J.L.M.R. Reduced oocyte and embryo quality in response to elevated nonesterified fatty acid concentrations: a possible pathway to subfertility? **Animal Reproduction Science**, v.149, n.1-2, p.19-29, 2014.

VAN HOECK, V.; LEROY, J.L.M.R.; ALVAREZ, M.A.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; SCHNORBUCH.; BOLS, P.E.J.; LEESE, H.J.; STURMEY, R.G. Oocyte

developmental failure in response to elevated nonesterified fatty acid concentrations: mechanistic insights. **Reproduction**, v.145, n.1, p. 33-44, 2013.

VAN HOECK, V.; STURMEY, R.G.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZADAN, A.; LEESE, H.J.; BOLS, P.E.J.; LEROY, J.L.M.R. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. **Plos One**, v. 6, 2011.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, 2002.

VANHOLDER, T.; LEROY, J.L.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; MAES, D.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 33–44, 2005.

VANHOLDER, T.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. **Reproduction Nutrition Development** v. 46, p. 105–119, 2006.

WANG, Y.; LI, C.; ALI, Y.; LI, L.; WANG, G. N-acetylcysteine modulates non-esterified fatty acid-induced pyroptosis and inflammation in granulosa cells. **Molecular Immunology**, v. 127, p. 157-163, 2020.

WEBB, R.; GARSWORTTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. E63-E74, 2004.

WILTBANK, M. C.; FRICKE, P.M.; SANGSRITAVONG, S.; SARTORI, R.; GINTHER, O.J. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.12, p.2998-3007, 2000.

WOLFENSON, D.; INBAR, G.; ROTH, Z.; KAIM, M.; BLOCH, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v.62, p.1042-1055, 2004.

WU, Q.; ORTEGON, A.M.; TSANG, B.; DOEGE, H.; FEINGOLD, H.R.; STAHL, A. FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. **Molecular and Cellular Biology**, v.26, n.9, p.3455-67, 2006.

XIAO, X.; LI, H.; QI, X.; WANG, Y.; XU, C.; LIU, G.; WEN, G.; LIU, J. Zinc alpha2 glycoprotein alleviates palmitic acid-induced intracellular lipid accumulation in hepatocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 439:155–64, 2017.

YENUGANTI, V. R.; VIERGUTZ, T.; VANSELOW, J. Oleic acid induces specific alterations in the morphology, gene expression and steroid hormone production of cultured bovine granulosa cells. **General and Comparative Endocrinology**, v.232, p.134-44, 2016.

ZULU, V.C.; SAWAMUKAI, Y.; NAKADA, K.; KIDA, K.; MORIYOSHI, M. Relationship among insulinlike growth factor-I, blood metabolites and post partum ovarian function in dairy cows. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, p. 879-885, 2002.

## ANEXO A – COMPROVANTE DO CEUA



**UDESC**  
UNIVERSIDADE  
DO ESTADO DE  
SANTA CATARINA

**LAGES**  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
AGROVETERINÁRIAS

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "A Injeção intrafolícular de ácido palmitico inibe a ovulação em fêmeas bovinas?", protocolada sob o CEUA nº 7067091220 (001277), sob a responsabilidade de **Rogério Ferreira** e equipe; Ana Paula Agostini - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 16/12/2020.

We certify that the proposal "Does intrafollicular injection of palmitic acid inhibit ovulation in cows?", utilizing 40 Bovines (40 females), protocol number CEUA 7067091220 (001277), under the responsibility of **Rogério Ferreira** and team; Ana Paula Agostini - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 12/16/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **01/2021** a **06/2021**      Área: Zootecnia

Origem:	<b>Animais de proprietários</b>	sexo:	<b>Fêmeas</b>	idade:	<b>3 a 7 anos</b>	N:	<b>40</b>
Espécie:	<b>Bovinos</b>			Peso:	<b>400 a 550 kg</b>		
Linhagem:	<b>Hereford/Angus</b>						

Local do experimento: Propriedade particular localizada em Uruguaiana/RS

Lages, 02 de setembro de 2022

José Cristani

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Pedro Volkmer de Castilhos

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina