ANDRÉA MENDES MARANHÃO

Efeito do polimorfismo do gene do GH e suas relações com os níveis de IGF-1, progesterona e escore corporal, produção de leite, dias em aberto em vacas Holandesas no início da lactação

São Paulo
2003

ANDRÉA MENDES MARANHÃO

**Efeito do polimorfismo do gene do GH e suas relações com níveis de IGF-1,
progesterona e escore corporal, produção de leite e dias em aberto em vacas Holandesas
no início da lactação**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Reprodução Animal da Faculdade de
medicina Veterinária e Zootecnia da
universidade de São Paulo para obtenção do
título de doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Profa. Dra. Valquíria Hyppólito Barnabe

São Paulo

2003

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1308
FMVZ

Maranhão, Andréa Mendes

Efeito do polimorfismo do gene do GH e suas relações com níveis de IGF-1, progesterona e escore corporal, produção de leite e dias em aberto em vacas Holandesas no início da lactação / Andréa Mendes Maranhão. – São Paulo : A. M. Maranhão, 2003.

90 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2003.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Valquíria Hyppólito Barnabe.

1. Polimorfismo. 2. Hormônios do crescimento. 3. Hormônios progestacionais. 4. IGF-1. 5. Vacas. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Andréa Mendes Maranhão

Título: Efeito do polimorfismo do gene do GH e suas relações com níveis de IGF-1, progesterona, escore corporal, produção de leite e dias em aberto em vacas Holandesas no início da lactação

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
em Reprodução Animal da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram para realização do mesmo, em especial para Luciana Keiko Hatamoto, Marcílio Nichi e Adriana Cortez. Dedico também a todos os meus amigos.

Dedico com carinho muito especial e profunda admiração a minha tribo Xamânica (Ione, Léo, Tato, Fátima) por toda a energia e luz enviadas. Dedico a toda minha floresta, aliados, mestres e guias e a todos os elementos (Terra, Fogo, Água e Ar).

Aos meus pais, de quem me orgulho e agradeço por tudo. Dedico com todo carinho e amor ao Renato.

AGRADECIMENTOS

A Deus, ao Xamã, aos meus pais (Lusia e Manuel), a todos os meus amigos!

A Dra. Valquíria H. Barnabe pela orientação e a Dra. Carmen Neusa Cortada pela orientação e contribuição ao desenvolvimento deste trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio sob a forma de bolsa e auxílio pesquisa.

A Fazenda Leite Forty pela permissão em utilizar seus animais, bem como pela contribuição e disponibilidade de funcionários e pelo acolhimento.

A equipe do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia, do Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Sanidade Animal (VPS) da FMVZ-USP, pela amizade e companheirismo (Prof Dr. Leonardo José Richtzenhain; Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, Adriana Cortez (doutoranda); Alessandra Marnie M. G. de Castro (doutoranda); Vera Letticie de Azevedo Ruiz (mestranda); Renato Zonzini Bocabella (estagiário FMVZ Londrina); Nanci do Rosário Vieira (mestranda); Lara Borges Keide (doutoranda), Mônica Lauvison (estagiária biologia).

Ao Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do departamento de Reprodução Animal ; (VRA) da FMVZ-USP pela preciosa colaboração. Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira; Érika Cristiane Gutierrez Felipe (Técnica de nível superior).

Ao pessoal do Depto. Reprodução Animal: Luciana, Marcílio Paola, Ana Karina, Vinícios, Ricardo (Snarf), Eduardo, Dona Sílvia, Harume, pela colaboração e amizade.

Ao Renato (Tatu) Roberta , Deni, Luciana, Marcílio, Snarf, Carmen , meu pai, Vinícios, Gonzalo, pelas idas e vindas a fazenda Leite Forty, ajudando na coleta de sangue e dados do rebanho.

A Sandra, Alexandre e Poliana pela ajuda que veio de Jaboticabal.

Ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento pela compreensão e colaboração. Dr. Luis Chaguri Neto, Dr. Vanderlei Antune, Dr. Benedito maurício Bissoli; Dr. Celso Gabriel H. Nascimento, Dra Ione Mabe; Dra Luralice; Dra. Luciana Pomilio; ; Dra Geni Abejon; Dra. Valéria S. Homen, estagiários Fernando, João Felipe e Joelma (por suportarem as lamentações de um pós-graduando com paciência e carinho).

A minha tribo Xamânica: Ione Cirilo, Leonardo P. Brandão , Renato Veiga e Fátima, pela energia e pensamentos! Muito obrigada, principalmente pela amizade!

A todas as vaquinhas que serviram de unidade experimental para este trabalho... Muito obrigada pela contribuição!

AGRADECIMENTOS

EPIÍGRAFE

“A luta contra o erro tem algo de homérico. Durante a revisão os erros se escondem, fazem-se positivamente invisíveis. Mas assim que o livro sai, tornam-se visibilíssimo, verdadeiros sacis a nos botar a língua em todas as páginas. Trata-se de um mistério que a ciência ainda não conseguiu decifrar...”.

(Monteiro Lobato)

RESUMO

MARANHÃO, A. M. **Efeito do polimorfismo do gene do GH e suas relações com níveis de IGF-1, progesterona e escore corporal, produção de leite, dias em aberto em vacas Holandesas no início da lactação.** [GH gene's polymorphism effect and your relationship with IGF-1 levels, progesterone and score condition, milk production, days open in Holstein cows in early lactation]. 2003. 90 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Foram utilizados 60 animais da raça Holandesa, distribuídos em 2 grupos de acordo com número de lactação e em dois tempos de acordo com época de concepção. Para Alu-1, animais com genótipo Leu/Leu apresentaram maior produção de leite na lactação ($p = 0,016$) e tendência para maior produção ao pico ($p = 0,054$) que animais do genótipo Leu/Val. Não foi possível demonstrar efeito de genótipo para Dde-1 sobre nenhuma das variáveis estudadas. Houve correlação positiva entre níveis de IGF-1 e P4 ($R^2 = 0,28$ e $p = 0,011$), correlação negativa entre IGF-1 DEAs, produção na lactação e produção ao pico de lactação ($R^2 = -0,267$ e $p = 0,016$; $R^2 = -0,424$ e $p = 0,0001$; $R^2 = -0,231$ e $p = 0,0001$, respectivamente). Houve tendência de correlação positiva entre escore corporal e níveis de P4 ($R^2 = 0,216$ e $p = 0,053$). Conclui-se que o polimorfismo do fragmento de restrição identificado pela Alu-1 possa ser utilizado como marcador genético importante para seleção de gado leiteiro, e que o polimorfismo para Dde-1 não se apresentou como um bom marcador genético a ser utilizado para a raça Holandesa, o nível plasmático de IGF-1 parece ser um bom indicador do retorno a atividade reprodutiva.

Palavras-chave: Polimorfismo, Hormônio de Crescimento, Progesterona, Vacas

ABSTRACT

MARANHÃO, A. M. **.GH gene's polymorphism effect and your relationship with IGF-1 levels, progesterone and body condition, milk production and days open in Holstein cows in early lactation.** [Efeito do Polimorfismo do gene do GH e suas relações com níveis de IGF-1, progesterona e escore corporal, produção de leite, dias em aberto em vacas Holandesas no início da lactação] 2003. 90 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Sixty female Holstein cows were used in this experiment, animals were arranged random in two groups in agreement lactation number and conception time. Animals with ALU-1 genotype showed biggest milk production in lactation ($p = 0,016$) and tendency to biggest milk peak production than Leu/Val animals. Dde-1 didn't showed genotype effect for any variavels. There were positive correlactin among IGF-1 and progesterone ($R^2 = 0,280$ e $p = 0,011$). There were negative correlactin among IGF-1 and days open, lactation production, peak lactation ($R^2 = -0,267$ $p = 0,016$; $R^2 = -0,424$ $p = 0,0001$; $R^2 = -0,231$ $p = 0,0001$, respective). There were tendency of positive correlation ($R^2 = 0,216$ $p = 0,053$) among body condition and progesterone levels. Basead on the results of the experiment, the Alu-1 polymorphism could be used as genetic markers to milk cow selection; DDE-1 polymorphism isnt indicate like genetic marker in Holstein cows; the IGF-1 levels seems a good indicator to return reproduction activite.

Key words: GH polymorphism, progesterone, IGF-1, dairy cattle, post calving.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	
.....	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (GH).....	15
3.2 FATORES DE CRESCIMENTO SEMELHANTES À INSULINA (IGFs).....	17
3.3 PROGESTERONA (P4).....	20
3.4 AÇÕES INTEGRADAS ENTRE GH E IGF-1 SOBRE O METABOLISMO.....	21
3.5 RETORNO À ATIVIDADE OVARIANA NO PÓS-PARTO.....	23
3.6 BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO E RETORNO À ATIVIDADE REPRODUTIVA	
.....	25
3.7 ESCORE CORPORAL E RETORNO À ATIVIDADE REPRODUTIVA.....	30
3.8 INTERAÇÕES METABÓLICAS E HORMONAIS SOBRE A OVULAÇÃO.....	35
3.9 POLIMORFISMO NO GENE DO GH.....	43
3.9.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	44
3.9.2 CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO ALU-1 E DDE-1	46
3.9.3 PRINCIPAIS EFEITOS DOS POLIMORFISMOS DDE-1 E ALU-1	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 COLETA DE AMOSTRAS E LOCAIS PARA REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES.....	49
4.2 PROPRIEDADE UTILIZADA NO EXPERIMENTO.....	50
4.2.1 ESCOLHA DA PROPRIEDADE.....	51
4.2.2 MANEJO PRODUTIVO.....	51
4.2.3 MANEJO NUTRICIONAL E REPRODUTIVO.....	52
4.2.3 MANEJO SANITÁRIO.....	53
4.3 DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE DO GH.....	54
4.4 DOSAGENS DE IGF-1 E PROGESTERONA (P4)	58
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO CORPORAL.....	59

4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	59
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 QUANTO AOS ESCORES CORPORAIS OBTIDOS	62
5.2 QUANTO AOS DADOS PRODUTIVOS E REPRODUTIVOS.....	64
5.3 QUANTO AOS NÍVEIS DE IGF-1	67
5.4 QUANTO AOS NÍVEIS DE PROGESTERONA.....	69
5.5 POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DO FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO DO GENE DO GH COM Alu-1	71
5.6 POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DO FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO DO GENE DO GH COM Dde-1	77
5.7 RESULTADOS DAS CORRELAÇÕES (CORRELAÇÃO DE PEARSON).....	81
6 CONCLUSÕES.....	83
6.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

A eficiência da produção leiteira e do desempenho reprodutivo de bovinos, são influenciadas por mecanismos que controlam a utilização dos nutrientes para a formação dos diversos tecidos corporais, incluindo aspectos referentes ao potencial produtivo e também reprodutivo destes. Os hormônios envolvidos na regulação das reações metabólicas, diretamente através do controle das reações enzimáticas, ou indiretamente mediante a regulação da expressão gênica, assumem especial importância. Dentro deste contexto, o hormônio de crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) ocupam lugar de destaque.

O advento do rBST e seu emprego na pecuária de leite proporcionaram a realização de grande quantidade de trabalhos de pesquisa caracterizando os efeitos do GH sobre o metabolismo de bovinos leiteiros, bem como a ação do IGF-1 sobre a produção, mas poucos trabalhos abordam a relação destes fatores com os desempenhos produtivo e reprodutivo.

Atualmente, há discussões sobre a existência de relações entre o tipo animal, as condições ambientais de criação, as variações nas exigências nutricionais e na eficiência do aproveitamento dos nutrientes para a produção de leite e desempenho reprodutivo. Muitos trabalhos relatam as variações entre e/ou dentro de grupos raciais no tocante às necessidades nutricionais para a manutenção, atribuindo tais diferenças à existência de genótipos diferentes ou ainda à existência de genes polimórficos.

Pesquisas recentes, na área de biologia molecular, têm identificado marcadores genéticos associados às características produtivas, que poderiam ser utilizados para identificar raças, linhagens ou até mesmo indivíduos geneticamente superiores pela análise da sequência do DNA. Uma das técnicas utilizadas para alcançar este objetivo é a análise da existência de genes polimórficos no genoma de indivíduos.

Um dos genes, cuja estrutura tem sido estudada com o objetivo de identificar marcadores genéticos ligados às características produtivas, é o que codifica a síntese do GH, em função do controle que esse hormônio exerce sobre os processos metabólicos, controlando direta ou indiretamente através do IGF-1, o processo de crescimento e lactação.

O polimorfismo genômico pode causar alteração da função do gene, contribuindo para variações fenotípicas entre os animais. O conhecimento de genes importantes para as características bio-econômicas no sistema de produção pode oferecer benefícios à agroindústria. Em gado de leite, por exemplo, a identificação de alelos polimórficos que atuem sobre a produção poderia permitir um melhor planejamento dos sistemas de acasalamento com o objetivo de garantir uma maior frequência destes marcadores genéticos na população (BISHOP et al., 1991).

Deve-se também considerar a relação existente entre níveis de GH e de IGF-I, com níveis de LH, FSH, estrógenos e progesterona em vacas no início da lactação (em provável balanço energético negativo- BEN) como fatores que influenciariam o desempenho reprodutivo destes animais.

Não há dúvidas de que o GH e o IGF-1 possuem uma estreita relação quanto ao controle do crescimento tecidual e com eventos anabólicos e catabólicos que ocorrem no organismo. Tal fato é tão evidente que há propostas de autores (BISHOP et al., 1991; BURTON et al., 1994; LUCY et al., 1993) para utilizar os níveis de IGF-1 e o polimorfismo do gene do GH como indicadores do potenciais produtivo e reprodutivo a serem empregados nos processo seletivos para gado leiteiro.

Estima-se que a perda na produção de leite resultante de manejo inadequado seja em torno de US\$58,97/vaca/ano, podendo chegar a valores superiores, principalmente durante o início da lactação. Sabe-se também que, a taxa de concepção e o intervalo entre partos, juntos, são responsáveis por custos de US\$136, 49/vaca/ano (JORDÃO, 1993). Portanto, a identificação de indivíduos com maior potencial produtivo permite melhorar o sistema de

criação, bem como as condições de manejo para atingir melhores desempenhos produtivo e reprodutivo, diminuindo os custos totais de produção.

Por outro lado, a biologia molecular tornou-se uma ferramenta preciosa para a melhor compreensão da potencialidade produtiva e reprodutiva de rebanhos e deve ser utilizada, sempre que possível, pois fornece informações mais precisas sobre a potencialidade animal, uma vez que fatores nutricionais e ambientais são características variáveis, mas o genótipo dos indivíduos não muda.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- Identificar, no período entre parto até o pico de lactação, a presença de polimorfismos no gene do GH de vacas da raça Holandesa, pertencentes a grupos com capacidade produtiva variável (média de produção de 15 a 45 kg leite).
- Estudar o efeito dos genótipos sobre os níveis plasmáticos dos hormônios IGF-I e progesterona; sobre o escore corporal, dias em aberto (DEAs) e nível de produção (kg) ao pico e período de lactação.
- Correlacionar os níveis de IGF-1, progesterona e escore corporal com dias em aberto (DEAs) e com nível de produção na lactação (kg) e no pico de lactação (kg).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para poder compreender o complexo mecanismo de interação entre balanço energético negativo, retorno a atividade reprodutiva e produção de leite, há necessidade de se estudar como os hormônios envolvidos com estes eventos atuam sobre o metabolismo de vacas de alta produção no início do pós-parto.

3.1 HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (GH)

O hormônio de crescimento (GH) é um hormônio protéico sintetizado pela adenohipófise. Possui cadeia polipeptídica simples, com aproximadamente 191 aminoácidos, contendo duas pontes dissulfeto. Sua estrutura é composta por quatro cadeias α hélices, antiparalelas que sofrem rotação à esquerda (PELL; BATES, 1990).

O controle da produção e secreção do GH é bastante complexo. O hormônio liberador de GH (GRF) estimula a hipófise a liberar GH, enquanto a somatostatina (SRIF) inibe a liberação de GH (ABE et al., 1983). O GRF e a SRIF são secretados no hipotálamo e transportados para os seus sítios de ação, na hipófise, através do sistema portal vascular hipotálamo-hipofisário (GLUCKMAN; BREIER, 1987).

Burton et al. (1994) enfatizaram que a concentração sanguínea de GH sofre regulação por parte de uma série de alças de retroalimentação negativa, que operam através de uma cascata de secreções hormonais, controlando não somente a secreção, como também a transcrição e tradução do RNAm do gene do GH. A secreção de GH também é controlada pelas flutuações nas concentrações sanguíneas de glucagon, insulina, fatores de crescimento semelhante a insulina (IGF-1, principalmente), hormônios estrogênicos e o hormônio

liberador da tireotrofina (TRH). O próprio GH exerce controle de sua secreção, inibindo a liberação de GRF e estimulando a liberação de SRIF, quando atinge concentrações elevadas.

Estudos realizados por Pell e Bates (1990) com animais hipofisectomizados ou tratados cronicamente com GH, demonstraram que o GH também regula a expressão do seu receptor. Entretanto essa regulação apresenta padrões diferenciados nos vários tecidos ou estados fisiológicos.

O GH está presente na circulação sangüínea ligado a uma proteína transportadora. Davis et al. (1992) identificaram uma proteína ligante de GH (GHBP) em ruminantes. As funções da GHBP não estão perfeitamente definidas, mas acredita-se que sejam responsáveis pelo transporte e pelo prolongamento da meia vida do GH presente na corrente sangüínea.

A secreção do GH em mamíferos adultos é pulsátil e o significado fisiológico deste fato permanece não esclarecido. Em ruminantes adultos, além disso, a secreção é assíncrona e episódica. Devido a esta natureza pulsátil, bem como às influências ambientais e nutricionais que exercem efeitos sobre a liberação do GH, a medição de sua concentração plasmática é muito pouco confiável em condições de campo (BREIER; GLUCKMAN, 1991).

A amplitude e a frequência dos pulsos do GH é dependente da idade, sendo maior durante a puberdade, declinando com o avançar da idade. Burton et al. (1994) relataram que a concentração sangüínea de GH em bovinos varia de 10 a 15 ng/mL nos primeiros meses de vida, decaindo para 2 a 8 ng/mL durante a fase pré-púbere, atingindo picos de 15 a 18 ng/mL próximo à puberdade, estabilizando-se na faixa de 5 a 10 ng/mL no animal adulto.

O GH promove resposta fisiológica através da interação direta com seus receptores teciduais e indiretamente através do estímulo à produção de fatores de crescimento, principalmente IGF-1 ou através da modulação da atividade de outros hormônios como a da insulina (GLUCKMAN; BREIER, 1987; PELL; BATES, 1990).

Entretanto, de acordo com Lawrence e Fowler (1997), a função mais importante do GH refere-se à influência que o mesmo exerce sobre a formação de proteína e ácidos nucleicos dos tecidos corporais. Este estímulo da síntese protéica é provavelmente resultante de um aumento na atividade dos ribossomos envolvidos nos processos de transdução.

Os efeitos do GH nos animais podem ser resumidos em duas categorias, de curto e longo tempo de duração. No homem e em ruminantes, a função de curto tempo do GH é basicamente a de economizar proteína. Por exemplo, durante jejum de 24 horas a concentração plasmática de GH aumenta e a proteína corporal passa a ser economizada às custas da degradação da gordura de reserva, a fim de se combater o déficit energético (GLUCKMAN; BREIER, 1987; PELL; BATES, 1990).

O efeito de longa duração do GH relaciona-se com o aumento no aporte de nutrientes para tecidos alvos, que se modificam dependendo do estágio de desenvolvimento ou estágio fisiológico do animal. Cita-se o crescimento dos tecidos esqueléticos e musculares na época da puberdade e nos indivíduos adultos a regulação da composição corporal, desenvolvimento e funcionamento da glândula mamária, entre outros (GLUCKMAN; BREIER, 1987; PELL; BATES, 1990).

Portanto como a medição dos níveis de GH é pouco confiável em condições de campo, o seu efeito sobre o metabolismo produtivo e reprodutivo é melhor caracterizado através do estudo da expressão do seu gene.

3.2 FATORES DE CRESCIMENTO SEMELHANTES À INSULINA (IGFs)

O IGF-1 consiste em um peptídeo de caráter básico composto por 70 aminoácidos, que possui seqüência de aminoácidos e estrutura tridimensional muito semelhante à insulina,

embora seja produto de gene diferente (GLUCKMAN; BREIER, 1987; PELL; BATES, 1990).

O IGF-1 é claramente GH-dependente. Sua concentração plasmática é baixa quando há baixos níveis de GH e elevada quando há excesso de GH plasmático (GLUCKMAN; BREIER, 1987; PELL; BATES, 1990).

Atualmente muitos autores sugerem que IGFs são produzidos em múltiplos sítios e não somente em tecido hepático como se acreditava antes, sendo estes também responsáveis pela concentração de IGFs circulantes e pela sua mediação sobre os efeitos do GH sobre o crescimento somático (BURTON et al., 1994; DISKIN et al., 2003; MONGET e BONDY, 2000; PELL; BATES, 1990; ROCHE et al., 2000).

A concentração plasmática de IGF-1 em humanos e animais domésticos é estável, não apresentando picos de produção devido à sua meia-vida biológica ser bastante longa. A concentração de IGF-1 é baixa até o nascimento do indivíduo quando então passa a se elevar lentamente, concomitantemente com o aparecimento de receptores de GH no fígado, o que aparentemente comprova sua dependência em relação à ação do GH sobre o nível de secreção de IGF-1, como sugerido por alguns autores (BREIER; GLUCKMAN, 1991; BURTON et al., 1994; PELL; BATES, 1990).

A concentração basal de IGF-1 em bovinos é bem mais elevada que a do GH, variando de 100 ng/mL de sangue na fase pré-púbere até 2000 ng/mL próximo à puberdade, com valor médio em torno de 100 ng/mL em animais adultos (BURTON et al., 1994).

Segundo Baumrucker, Handsell e Blum (1994), o IGF-1 liga-se a receptores próprios distribuídos pelo organismo (Tipo I e II) e esta ligação leva à atividade promotora de crescimento (proliferação e diferenciação celular, por exemplo) e a receptores de insulina, no tecido adiposo, promovendo atividade de modulação metabólica como captação e oxidação

de glicose para a produção de gordura, estimulando lipogênese e inibindo a lipólise (atividade semelhante à insulina).

Aproximadamente 95% do IGF-1 circulante encontra-se acoplado a seis tipos de proteínas ligantes, denominadas "insulin-like growth factor binding proteins" (IGFBP). Em muitas espécies, entretanto, existem duas formas predominantes a IGFBP-3 e a IGFBP-2. A predominância de uma ou de outra no plasma sanguíneo é modulada por uma série de fatores dentre os quais o nível nutricional e as concentrações plasmáticas de GH, IGF-1 e insulina (SKAAR et al., 1994).

Segundo Breier e Gluckman (1991), atualmente existem inúmeras evidências de que as IGFBPs podem desempenhar um papel funcional de distribuição ou, alternativamente, nas ações autócrinas e parácrinas dos IGFs, garantindo que os IGFs secretados pelas células sejam retidos localmente e, portanto, exerçam suas ações na mesma célula ou na população celular adjacente. Desde que as diferentes concentrações plasmáticas de IGFBPs parecem estar sob regulação endócrina e metabólica independente, as mesmas podem possuir diferentes significados fisiológicos.

Breier (1999) verificou que o aumento da concentração plasmática de GH pode aumentar a síntese do IGF-1, bem como sua concentração plasmática, além de modular a ação do IGF-1 no tecido alvo, principalmente através da IGFBP-2 e IGFBP-3. Observou também que ocorre um aumento de IGFBP-3 enquanto a IGFBP-2 diminui em altos níveis de GH plasmático. Estas mudanças nas concentrações das proteínas IGFBPs pode aumentar ou diminuir a disponibilidade de IGF-1 para os tecidos alvos. Em ovelhas e em humanos foi observado que o aumento dos níveis de GH leva a um aumento dos níveis de IGFBP-3 que seria responsável pela diminuição dos níveis de IGF-1 "livre".

3.3 PROGESTERONA (P4)

A progesterona é um hormônio esteróide, secretada pelas células do corpo lúteo, placenta e glândula adrenal. e sua secreção é estimulada pelo hormônio luteinizante (LH) e pelo hormônio folículo estimulante (FSH). A progesterona circula ligada à globulina de ligação dos esteróides sexuais (SSBG) (45%), à albumina (50%) e 1-2% na forma livre. Apresenta vida-média curta e é convertida no fígado em pregnanediol que é conjugado com o ácido glicurônico e excretado na urina.

Sua função relaciona-se à preparação do endométrio para a implantação do embrião e manutenção da gestação (estimula glândulas secretoras do endométrio e inibe a motilidade do miométrio), induz ao comportamento de estro (juntamente com os estrógenos), desenvolve o tecido secretor da glândula mamária (HAFEZ, 1993).

Altos níveis de progesterona inibem o ciclo estral e a onda de LH (hormônio luteinizante) que induz à ovulação. Após o parto os níveis de progesterona diminuem consideravelmente, permitindo o aparecimento do estro e a ocorrência da ovulação. De fato, a progesterona desempenha um importante papel na regulação hormonal do ciclo estral, principalmente no retorno à atividade ovariana no pós-parto (BALSALOBRE; CORSI; SANTOS, 1996; BUTLER; SMITH, 1989).

O nível de progesterona no plasma sanguíneo maior que 1 ng/mL indica o início da atividade luteínica ovariana. Estudo realizado em vacas holandesas e pardo suíço, logo após o parto, avaliou o nível de progesterona no plasma e correlacionou com o pico de produção leiteira e com o dia dessa produção, essas correlações foram muito baixas com R^2 de 0,0619 e 0,0492, indicando que a atividade luteínica é independente da produção leiteira em uma faixa de picos de produção de 12,50 a 23,60 kg/dia (BALSALOBRE; CORSI; SANTOS, 1996)

3.4 AÇÕES INTEGRADAS ENTRE GH E IGF-1 SOBRE O METABOLISMO

Em animais adultos, a habilidade do GH em manter os níveis plasmáticos de IGF-1 é drasticamente prejudicada quando há redução da ingestão alimentar, provocando uma redução do número de receptores de GH (BREIER; GLUCKMAN, 1991).

Recentes pesquisas realizadas em ratos demonstraram que tanto os níveis do mRNA que codifica os receptores de GH quanto os que codificam a síntese de IGF-1 no fígado são marcadamente reduzidos pelo jejum prolongado, mas estes dois parâmetros não sofrem alterações quando em tecidos extra- hepáticos. Estes dados confirmam a hipótese de que a regulação dos receptores de GH e dos níveis de IGF-1 obedece a diferentes mecanismos de controle e regulação nos diferentes tecidos durante os períodos de má nutrição (BREIER; GLUCKMAN, 1991; BUTLER, 2000; DISKIN et al., 2003; GONG, 2002; ROCHE; MACKEY; DISKIN, 2003).

A relativa resistência ao GH que animais subnutridos apresentam, bem como as mudanças que ocorrem quanto aos níveis plasmático do GH e do IGF-1, podem representar um mecanismo que utiliza preferencialmente substratos para a manutenção da homeostase ao contrário de empregá-los para o crescimento e proliferação celular. Recentes dados obtidos pelos autores mostram que ratos tratados com IGF-1 durante período de jejum prolongado apresentaram redução na perda de peso provavelmente devido à manutenção relativa de níveis plasmáticos de IGF-1.

Desde que a sobrevivência do indivíduo em jejum prolongado dependa de um aumento no catabolismo, pode ser que a redução plasmática de IGF-1, observada nestes casos, possa permitir um aumento da mobilização das reservas corporais. Segundo Breier e Gluckman (1991), a função do IGF-1 circulante pode não estar relacionada à promoção de crescimento, mas sim à adaptação metabólica.

Segundo Monget e Bondy (2000) e Monniaux et al. (1997), a resistência ao GH quando do déficit energético, permite um declínio na secreção de IGF-1 e reduz sua concentração plasmática, juntamente com a alteração na distribuição do mesmo através das IGFBPs. A diminuição da concentração de IGF-1 permite um aumento na taxa catabólica, conservando a proteína para funções biológicas essenciais, limitando a utilização das mesmas para o crescimento, aumentando a mobilização de gordura corporal e, portanto, os níveis plasmáticos de NEFAs.

Um grande número de dados sugere que a chave da regulação nutricional sobre o eixo somatotrófico é o nível de receptores de GH. O mecanismo pelo qual o IGF- 1 exerce o efeito anti-catabólicos ainda precisa ser elucidado.

A concentração de IGF-1 e a resposta ao GH mostraram-se reduzidas quando há períodos de baixa ingestão protéica e ou energética. Este fato foi demonstrado em trabalho realizado por Elsasser, Rumsey e Hammond (1989) que observaram um incremento dos níveis basais de IGF-1, bem como de sua concentração plasmática, após uma elevação dos níveis de GH que, segundo o observado pelos autores, estava relacionado a um aumento na ingestão protéica.

Segundo Burton et al. (1994), a secreção elevada de IGF-1 e de suas proteínas ligantes, as quais estão associadas ao nível elevado de GH, exercem um controle inibitório crônico na secreção de GH, através de sua ação nos sítios regulatórios superiores (adenohipófise, hipotálamo e sistema nervoso central).

De acordo com Ross e Buchanan (1990), quando há jejum prolongado, poderia ocorrer uma redução plasmática coordenada dos níveis de IGF-1 por dois mecanismos: primeiramente através da queda na secreção da mesma, devido a maior resistência ao GH e através do incremento do “clearance” de IGF-1 plasmático, observados nestes casos.

Como tem sido sugerida, a diminuição das concentrações plasmática de IGF-1 pode ser um importante mecanismo para a adaptação metabólica durante a subnutrição, sendo que a ação do IGF-1 em um tecido pode ou não sofrer alterações nesta situação, dependendo de qual ação específica precisará ser preservada (reprodução ou produção, por exemplo).

3.5 RETORNO À ATIVIDADE OVARIANA NO PÓS-PARTO

A duração do anestro pós-parto é influenciado por fatores ambientais, genéticos, fisiológicos e metabólicos, incluindo diferenças entre raças, nível nutricional, amamentação, produção de leite e potencial genético para a produção de leite. Segundo Butler e Smith (1989), para a ocorrência da primeira ovulação no pós-parto é necessário o restabelecimento do funcionamento do eixo hipotálamo-hipofisário-ovariano através da seguinte sequência: involução uterina, recuperação dos efeitos inibitórios que as gonadotrofinas liberadas pela ocasião da amamentação e início da lactação provocam sobre o ciclo ovariano, desenvolvimento de uma fase luteínica curta com ou sem ovulação prévia e ocorrência do estro com fase luteínica adequada para promover uma provável prenhez.

A retomada do padrão de secreção do eixo hipotálamo-hipofisário-ovariano envolve a liberação de gonadotrofinas, principalmente LH e FSH (hormônio foliculo estimulante), produzidos na hipófise. Desta forma, a concentração de FSH (produzido pelas células ovarianas) aumenta nos primeiros 3 a 5 dias do pós-parto, enquanto o padrão de secreção de LH só retorna ao normal cerca de 10 a 20 dias do mesmo, quando a liberação de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas, produzido no hipotálamo e que age na hipófise) também se normaliza. A retomada dos padrões episódicos de pulso do LH é o primeiro sinal

da retomada da atividade ovariana, bem como a elevação dos níveis de progesterona (BUTLER; SMITH, 1989).

De acordo com Butler e Smith (1989), os baixos níveis de progesterona no primeiro estro pós-parto é devido principalmente aos baixos níveis de FSH e não tanto aos níveis de LH. Porém, os baixos níveis de FSH antes da primeira ovulação pode ser resultado do frágil corpo lúteo (resultado da exposição a altos níveis de prostaglandinas durante a involução uterina), apresentado pela vaca durante o cio silencioso (o cio silencioso em vacas pode ocorrer duas a três semanas do pós-parto, embora o primeiro ciclo estral fértil ocorra mais tardiamente).

Em trabalho realizado por Thatcher et al. (2001) foram analisadas 543 vacas no pré-parto até pico de lactação, estudando inúmeros fatores. Dentre eles, o experimento mediu os níveis de progesterona nos dias 51 e 63 do pós parto. Vacas com níveis de progesterona iguais ou inferiores a 1ng/mL foram consideradas em anestro. Foi observado que 23,4% das vacas estavam em anestro e ainda não tinham retomado o padrão de funcionamento ovariano até o dia 63 pós-parto, sendo que a frequência de anestro foi maior entre as primíparas (35,6%) do que multíparas (16,9%).

Neste experimento também foi considerado o escore corporal, dividindo os animais em escores menores que 2,5 e maior e igual a 2,5. A taxa de concepção nos dias 27 e 45 após a inseminação foi de 18,1% e 11,1% (respectivamente) para vacas com escores inferiores a 2,5, e 33,8% e 25,65% (respectivamente) para vacas com escore corporal acima de 2,5. Os resultados foram significativos para $p < 0,05$.

Em bovinos o tempo requerido para a involução uterina varia em média de quatro a seis semanas (HAFEZ, 1993). O nível plasmático de progesterona permanece baixo durante o anestro, elevando-se conforme a retomada da atividade ovariana. O intervalo entre o parto e a primeira ovulação é bastante variável em vacas (10 a 110 dias), permanecendo em média ao

redor de 35 dias em vacas leiteiras, lembrando que as vacas primíparas ovulam mais tardiamente se comparadas às multíparas. De acordo com o descrito, a taxa de concepção é mais baixa no primeiro estro que no período subsequente, devendo a vaca leiteira ser inseminada após 60 dias do parto e a concepção ocorrer até 85 dias do pós-parto, para a manutenção de um intervalo entre partos de 12 meses (BUTLER, 2000; BUTLER; SMITH, 1989; HAFEZ, 1993).

Segundo Butler (2000) e Butler e Smith (1989), a eficiência reprodutiva do gado leiteiro pode ser avaliada por vários métodos. Dentre eles pode-se citar o intervalo entre partos, dias em aberto e número de serviços por concepção. O Intervalo entre partos e dias em aberto (período que compreende o nascimento do bezerro até a concepção) são medidas que dependem do manejo adotado na fazenda, sendo bons indicadores para avaliação da fertilidade do rebanho e do desempenho reprodutivo dos animais.

3.6 BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO E RETORNO À ATIVIDADE REPRODUTIVA

Melhorias genéticas promovidas nos rebanhos leiteiros, principalmente nos EUA, têm provocado marcante elevação da produção de leite, pelo menos nestas últimas três décadas. O aumento da produção está associado com a redução na taxa de concepção (66 % em 1951 versus 40 a 50% em 1975; BUTLER; SMITH, 1989). Segundo estudos mais recentes a taxa de concepção ao primeiro serviço, em vacas leiteiras, vem diminuindo 0,5 a 1% ao ano, nos últimos 25 anos nos EUA, como indicado na figura 1. (GONG, 2002). Este declínio tem sido atribuído, ao menos em parte, à intensa seleção genética sobre características produtivas destes animais, sem compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos. A maior demanda

energética para manter os altos níveis produtivos é fator intimamente envolvido no declínio do desempenho reprodutivo das vacas.

Fonte: BUTLER,2000

Figura 1- Relação entre seleção para produção de leite e taxa de concepção nos rebanhos norte americanos nos últimos anos.

Segundo Butler (2000), a energia é o primeiro componente nutricional limitante para produção leiteira de vacas no início da lactação. A demanda energética para a produção de leite e para a manutenção é superior à capacidade de ingestão de energia nestes animais, após o parto (Figura 2). Assim sendo, as vacas mobilizam suas reservas corporais para tentar equilibrar o déficit energético em que se encontram. Entram em lipólise, aumentando os níveis séricos de ácidos graxos não esterificados (NEFAs) e glicerol, que podem ser importantes indicativos do balanço energético negativo apresentado por estes animais (ROCHE, MACKEY; DISKIN, 2003; STAPLES et al., 1992). Tecidos periféricos utilizam os NEFAs como uma fonte de energia e como precursor da síntese de gordura do leite (BURTON et al., 1994) e o glicerol é utilizado pelo fígado na gliconeogênese (PEEL; BATES, 1987).

Fonte: Butler (2000)

Figura 2- Fases da lactação, produção de leite, condição corporal e ingestão de matéria seca (MS) em vacas leiteiras de alta produção.

Segundo trabalho publicado por Staples et al. (1992), vacas que produzam em média 25 litros de leite/dia precisam para tanto e para a manutenção, cerca de 30 Mcal/dia, embora seu consumo máximo chegue a 20 Mcal/dia, o que resulta em um déficit energético de - 10 Mcal/dia. A média de perda de peso corporal devido à mobilização de reservas pode chegar a 18,6 kg/semana. Em geral, este processo continua até cerca de 6 semanas do pós-parto, quando a energia ingerida via ingestão de matéria seca se iguala àquela necessária para a produção de leite e manutenção e a perda de peso chega próxima de zero. De acordo com os autores, vacas que conseguem ingerir cerca de 2% a 3,5% do seu peso corporal, em matéria seca, durante o período seco e nas primeiras seis semanas da lactação, sofrem menos com os efeitos do balanço energético negativo, permanecem menos tempo neste período de déficit energético e produzem mais leite, além de apresentarem melhor desempenho reprodutivo.

A proporção de gordura corporal em vacas holandesas é cerca de 29% de sua biomassa e trabalhos publicados nos últimos anos demonstraram que o ciclo estral destes animais é interrompido completamente quando a gordura da carcaça declina cerca de 8,6 % (STAPLES et al., 1992). Durante o início da lactação, mais de 60% do tecido adiposo de vacas holandesas pode ser mobilizado em decorrência do balanço energético negativo. Com isso, há um aumento plasmático dos NEFAs que parecem atuar como sinal periférico do déficit energético para o sistema nervoso central e que parece também estar relacionado com a secreção de LH (HAMUDIKUWANDA et al., 1996). Segundo Butler (2000) e Spicer, Tucker e Cedams (1990) , a redução da atividade luteínica, que está associada ao balanço energético negativo em vacas no início da lactação, pode ser resultado da redução dos níveis plasmáticos de IGF-1 (Figura 3).

O balanço energético negativo durante as primeiras 3 a 4 semanas do pós parto está altamente correlacionado aos dias a primeira ovulação e esta, por sua vez, está correlacionada a taxa de concepção. O intervalo parto/primeira ovulação representa uma importante interação entre status energético e performance reprodutiva de vacas leiteiras (BUTLER, 2000).

De acordo com trabalhos realizados por Roche, Mackey e Diskin (2000), Thatcher et al, (2001) e Yung et al. (1996) os efeitos do balanço energético negativo sobre o metabolismo pode ser resumido em : aumento da produção do GH, desacoplando a regulação entre receptores de GH e produção de IGF-1; diminuição da condição corporal; baixas concentrações de insulina, e glicose, aumento dos níveis plasmáticos de NEFAs, beta hidróxibutirato, e triacilglicerol. Sobre o desempenho reprodutivo descreve-se: diminuição da frequência de pulso do LH, diminuição do diâmetro do folículo dominante e, conseqüentemente, menor produção de estradiol; diminuição sistêmica de IGF-1 e, talvez, da disponibilidade de IGF-1 intra folicular, resultado numa maior perda de condição corporal e em maior porcentagem de anestro nas vacas do rebanho.

Outra importante ligação entre balanço energético negativo e fertilidade pode ser descrita pelos níveis de progesterona plasmático. Os níveis de progesterona aumentam na circulação periférica durante os primeiros 2 ou 3 ciclos ovulatórios, o déficit energético pode diminuir estes níveis. Vacas com severo déficit energético nos primeiros nove dias do pós parto, continuaram apresentado baixos níveis de progesterona nos três ciclos ovulatórios subseqüentes. A habilidade de produzir e manter altas concentrações de progesterona é importante para a fertilidade devido aos efeitos da progesterona no próximo ciclo (BUTLER, 2000).

Por outro lado, Hamudikuwanda et al. (1996) observaram que a progesterona, por ser hormônio esteróide, pode ficar armazenada no tecido adiposo durante a fase de gestação da vaca, quando está presente em grandes quantidades na circulação. No pós-parto, devido à alta produção de leite, quando da mobilização das reservas corporais, além dos NEFAs, ocorre também liberação da progesterona para a circulação sanguínea, que pode alterar os níveis plasmáticos da mesma. Segundo os autores, deve-se controlar a perdas de condição corporal, inclusive através das medições de níveis plasmáticos de progesterona em vacas no início da lactação.

Em gado leiteiro, o balanço energético nos primeiros 20 dias da lactação é importante na determinação do reinício da atividade ovariana no pós-parto. De acordo com Yung et al. (1996), o balanço energético negativo diminui o peso do corpo lúteo e a concentração de progesterona presente no sangue e no leite. Como a progesterona é necessária para a manutenção da prenhez, este efeito do balanço energético negativo sobre os ovários pode diminuir a fertilidade. Segundo os autores, o mecanismo pelo qual o balanço energético negativo pode afetar as células luteínicas seria através de seus efeitos sobre o IGF-I. As concentrações séricas de IGF-I são baixas em animais em balanço energético negativo (BREIER; GLUCKMAN, 1991) e isto está positivamente correlacionado com os níveis

séricos de progesterona em vacas em lactação (SPICER; TUCKER; CEDAMS, 1990). Para Yung et al. (1996) o IGF-I incrementa a síntese de DNA para a progesterona, bem como a sua secreção em culturas de células luteínicas de bovinos.

Trabalho realizado por Lucy et al. (1991), demonstrou que à medida que o nível energético da vaca torna-se positivo, no início do pós-parto, há um aumento no diâmetro dos folículos no décimo dia do pós-parto, no número de duplas ovulações, a detecção do primeiro corpo lúteo torna-se mais precoce e a amplitude média de pulso do LH também aumenta. De acordo com os autores, estas mudanças no número e tamanho dos folículos, bem como do número de ovulações estão associados com o aumento das concentrações não apenas do LH, mas também do FSH, insulina, IGF-1 e outros compostos ainda não determinados.

De acordo com Roche, Mackey e Diskin (2000) e Staples et al. (1992) a quantidade de nutrientes e energia requeridas para o crescimento folicular, fertilização do óvulo e implantação do embrião é bem pequena se comparada àquela requerida para a síntese diária de leite e metabolismo orgânico. Mudanças na concentração de metabólitos e hormônios reprodutivos, que são influenciados pela dieta e pelo status energético da vaca, representam os primeiros sinais para a regulação da atividade reprodutiva no pós-parto.

3.7 ESCORE CORPORAL E RETORNO À ATIVIDADE REPRODUTIVA

A primeira ovulação é retardada cerca de 2,75 dias para cada 1Mcal de balanço energético negativo nos primeiros 20 dias do pós-parto (STAPLES et al., 1992). A perda de condição corporal parece ser responsável pelo retardamento da atividade cíclica ovariana e, neste contexto, a medição da condição corporal passa a ser uma ferramenta bastante útil para relacionar desempenho reprodutivo com nível nutricional em vacas no início da lactação (BUTLER, 2000; BUTLER; SMITH, 1989; CHALUPA; GALLIGAN; FERGUNSON, 1996;

FERGUSON, 1996; ROCHE; MACKEY; DISKIN, 2000; SNYDERS et al. ,2000; STUDER, 1998).

Deve-se ressaltar que a realização de ensaios diretos para avaliar a severidade do balanço energético negativo por animal em um rebanho leiteiro, torna-se praticamente impossível (custos das análises, tempo para coleta das amostras e realização dos ensaios, entre outros). Entretanto, mudanças no escore corporal, embora seja uma medida indireta, é uma maneira rápida e barata para a avaliação do nível de balanço energético do animal e pode ser realizada para todos os animais do rebanho (BUTLER, 2000).

Segundo Chalupa, Galligan e Fergunson (1999), existem registros técnicos datados de 1694 que procuram relacionar escore corporal a parâmetros reprodutivos. De acordo com os autores a metodologia utilizada para avaliação do escore corporal pode ser encontrada em trabalhos publicados por Russel (1984), Weaver (1986), Wildman et al. (1982) e que ainda hoje é empregada. A classificação do escore corporal dos animais é feita em uma escala numérica de 1 a 5, onde 1 corresponde aos animais tidos como muito magros (caquéticos) e 5 corresponde aos animais tidos como muito gordos, sendo comum os autores variarem as escalas em subclasses de 0,25 a 0,5 entre as classificações.

ÍNDICES	Proc. Espinhoso	Proc. Transverso	Tecido de cobertura
0- Caquético	Muito proeminente	Muito proeminente	Não existente
1- Magro	Proeminente	Proeminente	Pouco profundo
2- Regular	Ligeiramente recoberto	Recoberto	Moderado
3- Bom	Palpado c/facilidade	Palpado c/pressão	Preenchido
4- Gordo	Palpado c/pressão	Não pode ser palpado	Camada de gordura
5- Muito Gordo	Não pode ser palpado	Não pode ser palpado	Grandes depósitos de gordura

Fonte: RUSSEL (1984)

Quadro 1- Parâmetros de avaliação do escore corporal de bovinos.

Fonte: Adaptado de Butler (2000); Chalupa; Galligan; Fergunson (1996) e Studer (1998)

Figura 3- Região a ser considerada quando da observação do escore corporal.

Os extremos da condição corporal (obesidade-caquexia) no peri-parto predispõe a vaca a problemas de saúde, reprodutivos e produtivos. Devido à inadequação entre ingestão de matéria seca e energia requerida para produção leiteira, a condição corporal muda durante o ciclo de lactação. A medida do escore corporal é um índice que mede o grau de gordura de reserva do animal, sendo este método bastante empregado nos Estados Unidos para este tipo de avaliação (CHALUPA; GALLIGAN; FERGUNSON, 1996).

Relata-se na literatura que vacas que apresentem alto escore corporal (acima de 3,75) na ocasião do parto exibem uma acentuada redução no apetite (portanto na ingestão de matéria seca) após o parto, desenvolvendo balanço energético negativo mais severo que vacas com escore corporal moderado (3,0-3,5). Vacas com escore corporal igual ou inferior a 2,5 apresentam redução na produção de leite e menor eficiência reprodutiva. Como resultado, em ambos os casos, estes animais apresentam maior intervalo para a primeira ovulação, além de uma redução da fertilidade (BUTLER, 2000; CHALUPA; GALLIGAN; FERGUNSON, 1996; STUDER, 1998). Portanto, deve-se monitorar a condição corporal da vaca não somente a partir do parto, mas durante o período seco e principalmente no peri-parto, para tentar diminuir os efeitos negativos causados por uma grande mobilização de gordura corporal sobre

o desempenho reprodutivo destes animais. O mesmo foi observado por Baruselli et al. (2001) em trabalho realizado em búfalas.

Muitos autores recomendam escore corporal de 3,0-3,5 como sendo adequado para a vaca no momento do parto. A partir deste, a vaca começa a mobilização das reservas energéticas, perdendo escore corporal até cerca de 30 dias do pós-parto. Deve-se tomar cuidado para que o escore corporal não atinja pontuações inferiores a 2,5 neste período. Com cerca de 100 dias de lactação, a vaca deve começar a restituir os níveis de reserva corporal até chegar próxima ao escore de 3,0-3,5 no período seco. Recomenda-se manter o escore corporal da vaca neste intervalo (3,0 - 3,5) durante o período seco até o próximo parto (BUTLER, 2000; CHALUPA; GALLIGAN; FERGUNSON, 1996; STUDER, 1998).

Quanto maior a perda de escore corporal após o parto, menor é a taxa de concepção. De acordo com Butler (2000), vacas que perdem uma unidade ou mais de escore corporal (numa escala de 0-5) durante o início da lactação apresentam um risco maior de redução na fertilidade, apresentando taxa de concepção de 17 a 38%, dependendo de quantos escores o animal perdeu. Segundo Studer (1998), a taxa de concepção média em rebanhos americanos é de 50%. Vacas que apresentem escore corporal 3,0, no momento da inseminação, possuem maior possibilidade de emprenhar do que animais com escore corporal inferior.

Snijders et al. (2001) realizaram um trabalho para avaliar se o mérito genético para a produção de leite interfere na eficiência reprodutiva de vacas leiteiras. Eles observaram que os animais de maior mérito genético (3819 Kg de leite $\pm$ 65,2 de alto mérito e 3433 kg de leite $\pm$ 64,5 de médio mérito) apresentaram menor condição corporal que os animais de médio mérito ($2,88 \pm 0,05$ e $3,33 \pm 0,05$, respectivamente), além de apresentarem maior queda na condição corporal que animais de médio mérito até a primeira ovulação ($-0,47 \pm 0,05$ e $-0,23 \pm 0,05$, respectivamente), os animais de maior mérito genético apresentaram maior número de serviços até a concepção (2,67) em relação aos animais de menor mérito genético (1,91);

sendo todos os resultados aqui apresentados estatisticamente significativos para $\alpha = 5 \%$.

Segundo Gong (2002), vários trabalhos demonstraram que vacas de alto mérito genético para a produção de leite apresentaram frequência de pulso e concentração de LH, concentração periférica de progesterona e níveis GhRH para indução da ovulação menores quando comparados as vacas de menor mérito genético. Estas diferenças nos parâmetros reprodutivos estão diretamente relacionadas aos baixos níveis de IGF-1 e insulina plasmáticos no início da lactação.

No trabalho publicado por Gong (2002), 18 animais de alto (AM) e baixo mérito (BM) para a produção de leite. Quanto ao intervalo entre parto/primeira ovulação, os animais AM tiveram duração de 29,7 dias contra 20,7 dias dos BM. A frequência de pulso de LH (medida durante 6 horas), foi de 3,1 para AM contra 4,7 para os BM; a taxa de concepção ao primeiro serviço foi de 32,8% para os AM contra 48,7 para os BM; os níveis de GH (ng/mL) foi de 16,7 para AM contra 12,8 BM, os níveis de insulina (ng/mL) foi de 0,35 do AM contra 0,46 dos BM; por fim, os níveis de IGF-1 (ng/mL) foi de 116,1 para os AM contra 165,4 para os BM.

Animais que chegam ao parto com escore corporal inadequado (acima de 3,5 e abaixo de 2,5) apresentam dias em aberto e intervalo entre partos muito longo, muitas delas podendo apresentar cistos ovarianos associados ao anestro (STUDER, 1998).

Deve-se ressaltar que há trabalhos na literatura que relatam efeito da queda no escore corporal sobre a qualidade de oócitos, bem como sobre seu desenvolvimento “in vitro”.

Em trabalho realizado por Dominguez (1995), estudou-se a relação existente entre escore da condição corporal e qualidade dos oócitos obtidos de vacas leiteiras em início de lactação (até 60 dias do pós-parto). As vacas que apresentaram menor condição corporal (escore 1 a 2) apresentaram menor número de oócitos normais em comparação com aquelas que apresentaram melhor condição corporal (3 a 4). Segundo o autor, estas vacas podem

produzir oócitos de menor qualidade e por isso podem apresentar menor taxa de concepção, retardando o retorno à atividade reprodutiva do animal.

Snyders et al. (2000) realizaram um trabalho que, entre outras coisas, avaliava o efeito do escore da condição corporal de vacas leiteiras sobre o número de oócitos destes animais, bem como seu desenvolvimento “in vitro”. Neste experimento foi utilizado um total de 40 animais sendo 20 vacas de alta produção leiteira (4559 a 5114 Kg) e 20 vacas de baixa produção (3162 a 3972 Kg). Os autores observaram que a clivagem e a taxa de formação de blastocistos dos oócitos foram maiores nas vacas que apresentavam maior escore corporal (3,3 a 4,0) se comparadas às vacas que apresentavam menor escore corporal (1,5 a 2,5).

Quanto aos prejuízos causados pela perda de escore corporal sobre o nível de produção de leite da vaca, observa-se que a perda de 0,5 ou 1,0 ponto no escore corporal representam energia necessária para a produção de 275,7 kg a 551,4 kg de leite (CHALUPA; GALLIGAN; FERGUNSON, 1996). Para Studer (1998), animais que chegam ao parto com escore de 3,0-3,5, podem produzir cerca de 55 kg de leite/dia a mais do que aqueles que chegam com baixo escore corporal.

Pelo exposto, a medição do escore de condição corporal de vacas leiteiras é uma importante ferramenta para o estudo dos efeitos do balanço energético negativo sobre a eficiência reprodutiva e produção de leite no início de lactação.

3.8 INTERAÇÕES METABÓLICAS E HORMONAIS SOBRE A OVULAÇÃO

A foliculogênese é um processo dinâmico caracterizado por proliferação e diferenciação dramáticas das células somáticas que compõem o folículo. Os principais reguladores deste processo são as gonadotrofinas que agem através de mecanismos endócrinos para controlar o crescimento folicular. Porém, os mecanismos de seleção folicular

não podem ser explicados exclusivamente pelo clássico sistema de retroalimentação hipotálamo-pituitário-ovariano (WEBB; ARMSTRONG, 1998).

Além dos conceitos extra-ovarianos de controle da foliculogênese, nas últimas três décadas, inúmeros trabalhos vêm demonstrando que os mecanismos intra-ovarianos são primordiais para a regulação da resposta dos folículos às gonadotrofinas (WEBB; ARMSTRONG, 1998).

A maioria dos estudos de fatores de crescimento intra-ovarianos demonstra que os IGFs (principalmente IGF-I) desempenham importante papel na foliculogênese. Assim sendo, os IGFs estimulam a proliferação e a diferenciação das células da granulosa e da teca (in vitro) e em ovelhas têm sido demonstrado (WEBB; ARMSTRONG, 1998) que o IGF-I age em sinergismo com o FSH para estimular a proliferação celular e a produção de estrógenos em folículos de pequeno tamanho.

A concentração de IGF-I em folículos grandes (pré-antrais) está positivamente relacionada com as concentrações séricas do mesmo. Após a imunização de novilhas contra o hormônio liberador de GH (GRF) as concentrações de IGF-I sérica e intrafolicular reduziram-se drasticamente, enfatizando a importância do IGF-I de origem endócrina para o bom funcionamento ovariano (MONGET; BONDY, 2000; MONNIAUX et al., 1997).

Lucy et al. (1992), observaram que os níveis de IGF-I foram positivamente correlacionados com a taxa estrógeno/progesterona no fluido dos folículos dominantes em vacas em balanço energético negativo. Estes dados corroboram com os encontrados em trabalho de revisão de Kastelic (1997); Lackey, Gray e Henricks (2000) e Monget e Bondy (2000) .

Zurek, Foxcroft e Knnelly (1995) realizaram trabalho com 21 vacas leiteiras no pós-parto, em balanço energético negativo, mensurando níveis plasmáticos de IGF-I, LH, NEFAs, taxa de gliconeogênese e correlacionando período anovulatório com o nível de secreção de

LH. De acordo com os resultados obtidos, os autores concluíram que a diminuição dos níveis plasmáticos de NEFAs e a elevação dos níveis plasmáticos de IGF-I parece ser um importante sinal para o eixo hipotálamo-hipofisário para o controle da função ovariana no pós-parto de vacas leiteiras. Estes dados puderam ser confirmados em trabalho realizado por Lackey, Gray e Henricks (2000) e Whitley et al. (1995) cujos resultados indicam que a infusão de IGF-I em vacas, neste período do pós-parto, aumenta a secreção basal de LH, melhorando o desempenho reprodutivo destes animais quanto à ovulação.

Cada folículo possui desenvolvimento próprio que dura em média de 7 a 10 dias e passam por diferentes estágios: emergência, seleção, dominância e atresia ou ovulação. Essas fases ocorrem dentro da chamada onda ovulatória, considerando que 95% dos animais possuem 2 ou 3 ondas foliculares dentro do ciclo estral e 5% podem apresentar até 4 ondas foliculares (DISKIN et al., 2003). Três distintos padrões de desenvolvimento folicular em vacas leiteiras têm sido descritos na literatura, baseado no destino da primeira onda folicular pós parto:

1. 46 % das vacas no pós-parto conseguem ovular na primeira onda ovulatória, apresentando um anestro de 20 dias (16-20 dias) .
2. 31% passam por 2 ondas foliculares anovulatórias até o primeiro folículo dominante ovular, apresentando um anestro de aproximadamente 51 dias.
3. 23% delas desenvolvem cisto ovariano a partir do folículo dominante, não apresentando estros férteis, com prolongado período de anestro.

De acordo com a revisão de Butler (2000); Diskin et al. (2003) e Roche, Mackey e Diskin (2002), vários trabalhos comprovam que o balanço energético negativo não prejudica o recrutamento dos folículos, bem como seu tamanho e diâmetro, até a seleção do folículo dominante. Segundo a literatura, o tempo de duração do anestro está intimamente associado à redução da frequência de pulso do LH. Os efeitos diretos da nutrição sobre a função ovariana

parecem estar relacionados à produção hepática de IGF-1, bem como da concentração do mesmo no fluido folicular. O déficit energético no pós-parto também atua sobre as proteínas ligadoras de IGF-1, cuja sua redução, aliada aos baixos níveis de insulina neste período, diminuem a resposta folicular ao LH, diminuindo a produção de estradiol e, conseqüentemente, aumentando o tempo para a ovulação. Estes estudos apontam que os níveis de IGF-1, insulina e proteínas ligantes de IGF-1, são os principais mediadores metabólicos que atuam sobre o retorno da atividade reprodutiva no pós-parto (Figura 3).

Fonte: Butler, 2000.

Figura 4- Modelo para descrição do desenvolvimento folicular em relação às mudanças metabólicas e hormonais quando do balanço energético negativo (EB), durante a primeira onda folicular em vacas no pós-parto.

Durante a primeira onda folicular, ou ocorre ovulação (*) ou atresia. A frequência de pulso do LH é modulada pela severidade e tempo de duração do balanço energético negativo (EB). As setas para cima indicam as ações desencadeadas pelo aumento dos níveis de IGF-1 e insulina, que permitem uma maior resposta folicular ao LH, aumentando a produção de estrógeno (E2) produzido pelo folículo dominante.

Segundo Gong (2002), o GH não exerce efeito direto sobre os folículos ovarianos em vacas, uma vez que os folículos ovarianos de bovinos não apresentam receptores para GH, por

outro lado, o IGF-1 e a insulina agem diretamente nos folículos, estimulando a esteroidogênese de forma dose/dependente.

De acordo com revisão feita por Diskin et al. (2003), vacas que apresentam menor intervalo entre parto/primeira ovulação apresentam maiores níveis de IGF-1 plasmático nas primeiras 2 semanas do pós parto, do que aquelas cujo anestro foi mais prolongado.

Em trabalho publicado por Butler (2000), vacas que ovularam na primeira onda folicular possuíam níveis de IGF-1 cerca de 40 a 50% maiores nas primeiras duas semanas do pós parto, se comparadas as vacas que precisaram de mais de uma onda folicular para ovular. Nestes estudos, as concentrações plasmáticas de estradiol também apresentaram-se mais elevadas nas vacas com ovulação mais precoce.

O mecanismo pelo qual o IGF-1 atua sobre a capacidade ovulatória do folículo dominante ainda não está muito claro, mas vários estudos sugerem que o IGF-1 poderia atuar diretamente estimulando a proliferação ou a capacidade esteroidogênica das células da teca e/ou das células da camada granulosa. Na literatura existem muitos trabalhos que, através de estudos “in vitro” comprovaram que o aumento dos níveis de IGF-1 contribui para o aumento do número de sítios de ligação do LH aumentando o estímulo das células tecais para a produção de progesterona. Estes estudos sugerem que o IGF-1 possui importante papel na resposta das células foliculares ao LH e, portanto, ao aumento da produção de estrógeno (pré-requisito para a ocorrência da ovulação) (DISKIN et al., 2003).

De acordo com a revisão de Diskin et al. (2003), a concentração de IGF-1 no fluido folicular de grandes folículos de bovino está positivamente correlacionada com os níveis plasmáticos do mesmo.

Vacas em lactação possui uma demanda muito alta de glicose, que é o substrato principal para a síntese de lactose do leite. As concentrações séricas de glicose estão reduzidas em vacas de alta produção, comparada com animais de menor produção. Muitos trabalhos

sugerem que a disponibilidade de glicose age sobre a secreção de LH, através de estímulos diretos sobre o sistema nervoso central (SNC).

A estratégia dietética para atender vacas de alto mérito genético para a produção de leite adotam dietas com alta inclusão de proteína (17 a 19%), por estimular a produção de leite; porém, altos níveis de proteína está relacionado a uma menor performance reprodutiva nestes animais (BUTLER, 2000). Alguns estudos demonstram que o excesso de proteína na alimentação atua piorando a fertilidade da vaca. Altos níveis protéicos geram grande produção de amônia no rúmen, que por sua vez é convertida em uréia, aumentando os níveis séricos da mesma e diminuindo a fertilidade.

De acordo com a revisão do autor, alta concentração de uréia plasmática pode alterar o pH uterino o que prejudicaria a sobrevivência do embrião. Parece que este efeito no tecido uterino ocorre somente durante a fase luteínica e não na fase estrogênica, e a principal explicação para este fato seria a interferência com a ação da progesterona no micro ambiente uterino, causando condições inadequadas para a implantação e desenvolvimento do embrião. Alguns autores sugerem que a ação deletéria das concentrações de uréia deve ocorrer no ambiente oócito/folículo ou no oviduto, muito mais que no útero.

Assim sendo, observa-se que complexas inter-relações metabólicas e hormonais estão envolvidas na produção e reprodução animal (Figura 5 e Figura 6). Estudos referentes à ação fisiológica do GH e IGF-I sobre o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras no início da lactação e em balanço energético negativo, ainda precisam ser realizados, para que se obtenha melhor compreensão destes eventos, o que contribuirá para incrementar ações que potencializem a produção leiteira e o desempenho reprodutivo.

Fonte: adaptado de Breier e Gluckman (1991); Burton et al. (1994); Butler (2000).

Figura 5- Interação hormonal: balanço energético negativo (Ben) X produção de leite.

Fonte: adaptado de Breier e Gluckman (1991); Burton et al. (1994); Butler (2000).

Figura 6- Interação hormonal: balanço energético negativo (Ben) X reprodução

3.9 POLIMORFISMO NO GENE DO GH

Marcadores genéticos, também chamados de polimorfismo, têm se transformado em uma preciosa ferramenta no auxílio aos programas de seleção animal, sua compreensão e identificação podem contribuir para estabelecer programas mais rápidos e eficientes de melhoramento animal (BISHOP et al., 1991; ZWIERZCHOWSKI et al. 2002).

3.9.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Marcadores genéticos são polimorfismos detectados em segmentos específicos de DNA, os quais seguem as leis mendelianas de herança, sendo resultantes de pequenas variações (mutações) na sequência de nucleotídeos. Muitas dessas modificações não provocam nenhum efeito fenotípico, enquanto outras promovem alterações na sequência de aminoácidos de proteínas, modificando suas características.

O DNA possui a característica de se dobrar a cada nucleotídeo, formando uma dupla-hélice, sendo que a base nitrogenada do nucleotídeo determina o ângulo de inserção na fita de DNA. Vários aspectos da composição de bases nitrogenadas e comportamento conformacional da fita de DNA foram descritos por Crothers, Haran e Nadeau (1990). Esta característica conformacional foi bastante estudada devido às suas implicações funcionais na transcrição, no empacotamento do DNA e acoplamento de proteínas (KIRKPATRIC; HUFF; CASAS-CARRILO, 1993).

As enzimas de restrição reconhecem sequências específicas de bases no DNA, e a alteração de um par de bases pode criar ou abolir um sítio de restrição em um determinado locus do genoma, gerando um polimorfismo. Dessa forma, se o DNA for digerido com a enzima de restrição adequada, o locus polimórfico pode ser observado pela alteração no

tamanho do fragmento do DNA. Este tipo de polimorfismo ficou conhecido como polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphisms) (FARAH, 1997).

Para a realização do método do RFLP, é necessário que a mutação (polimorfismo) já tenha sido descrita, pois só assim pode-se identificar os sítios de restrição para a enzima específica, ou escolher a sequência dos nucleotídeo iniciadores (“primers”), ou ainda para a síntese de oligonucleotídeos específicos para o alelo normal e o polimórfico (FARAH, 1997).

De acordo com trabalhos anteriormente citados, linhagens de gado selecionado para alta produção de leite liberam maiores quantidades de GH do que animais de menor mérito genético para produção. Existem na literatura muitos trabalhos a respeito de polimorfismo do GH e sua ação sobre a produção de leite. Dentre estes polimorfismo, muito se fala sobre a Msp-1e ALU-1, havendo poucos trabalhos sobre a Dde-1. A maioria dos trabalhos correlacionam estes polimorfismo com mérito genético para produção leiteira ou ganho de peso. Existe uma escassez de publicações sobre o efeito destes polimorfismos sobre o retorno da atividade reprodutiva no pós-parto de vacas leiteiras, de alta produção, que enfrentam severo balanço energético negativo no início do período de lactação.

No presente trabalho, procurou-se correlacionar o polimorfismo caracterizado por Alu-1 e Dde-1 com produção de leite e retorno a atividade reprodutiva de vacas leiteiras no pós parto ate o pico de lactação.

3.9.2 CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO ALU-1 E DDE-1:

Hart et al. (1984) observaram que a existência de respostas conflitantes sobre a ação do GH e do rBST, poderia ser atribuída, em parte, à possibilidade da fabricação do rBST ter sido realizada a partir do GH proveniente de genes polimórficos.

Tanto a posição do polimorfismo no gene, quanto a mutação que gerou o polimorfismo, podem variar conforme o grupo genético dos indivíduos. Assim, Hoj et al. (1993), trabalhando com animais da raça Dinamarquesa Vermelha, identificaram um polimorfismo Msp-1 na posição 836 (terceiro íntron) do gene GH, cujo haplotipo D - Msp (-), apresentava maior incidência na linhagem selecionada para alta produção de leite.

Utilizando a técnica SSCP (do inglês Single Strand Conformation Polimorfism) para análise de variações na sequência de nucleotídeos do gene do GH, Yao et al. (1996) identificaram, entre sete fragmentos analisados, quatro que apresentavam polimorfismos, sendo que destes, dois estavam associados à produção leiteira em gado da raça Holandesa. O polimorfismo, denominado GH 4.1, foi caracterizado como uma mutação entre os nucleotídeos T → C na posição 1547 (terceiro íntron do gene), enquanto que o GH 6.2 apresenta uma mutação entre os nucleotídeos A → C na posição 2291 (quinto exon do gene). Segundo os autores, o efeito médio dos genes envolvidos em GH 4.1 e GH 6.2 foi similar e corresponderia a um diferencial de produção da ordem de 300 kg de leite, 8 kg de gordura e 7 kg de proteína por lactação.

Através do sequenciamento destes fragmentos, os autores puderam constatar que o fragmento contendo a região do polimorfismo GH 4.1 (345 pares de base) apresentava dois sítios de restrição da enzima Msp-1. Um dos sítios de restrição Msp-1 não era polimórfico e o produto da digestão resultou em dois fragmentos, um de 59 e o outro de 286 pares de base (pb). Já no fragmento da região do GH 6.2 observou-se uma mutação que modifica a sequência de reconhecimento da enzima Dde-1, sendo, portanto, identificado como Dde-1 RFLP.

O gene do GH possui tamanho de 1,8 kb e consiste de 5 exons e 4 introns. Lucy et al. (1991) verificou um polimorfismo na região do exon 5 do gene do GH, que resultava na mudança de um nucleotídeo relacionado a ocorrência da variante leucina (Leu) ou valina

(Val) no aminoácido da posição 127 da proteína, mudando a molécula do GH e, provavelmente, suas propriedades biológicas. Neste trabalho, este polimorfismo foi associado às características relacionadas a produção de leite. Utilizando dois tipos de GH bovino recombinante em vacas leiteiras, Eppard et al. (1992), Schelee et al (1994) e Zwierzchowski et al. (2002) observaram uma menor resposta à produção de leite com uso do primeiro.

3.9.3 PRINCIPAIS EFEITOS DOS POLIMORFISMOS DDE-1 E ALU-1

Segundo Yao et al. (1996), o polimorfismo identificado pela enzima de restrição Dde-1 não implica em mudança de posição do aminoácido codificado (arginina) no gene do GH, mas a presença do polimorfismo (+/-) detectada por esta enzima está associada a uma maior produção de leite e de gordura e proteína do leite e também a uma maior liberação de GH e IGF-1 em vacas de alta produção.

Em trabalho realizado por Maranhão (2000), foi observado que animais da raça Caracu, com maior pressão de seleção para produção de leite, apresentaram maior frequência do alelo polimórfico (+/-) para Dde-1, corroborando com trabalho realizado por Yao et al. (1996).

Taylor et al. (1998), estudando marcadores moleculares no gene do GH encontrou evidências de que as variações genéticas observadas na mesma região em que ocorre o polimorfismo da Dde-1 estariam associadas com espessura da camada de cobertura da carcaça e extrato etéreo do músculo *longissimus dorsi*.

Vários trabalhos têm demonstrado que em gado selecionado para alta produção de leite a frequência genotípica do GH (polimorfismo Alu-1) Leucina/Leucina (L/L) é maior que a frequência Leucina/Valina (L/V) (ambos relacionados a uma maior atividade lipolítica),

sendo que a Valina/Valina (V/V) apresenta frequência muito baixa no gene do GH (SORENSEN et al., 2002; ZWIERZCHOWSKI et al., 2002). Constatou-se também que a concentração de GH no plasma sanguíneo era maior nos animais de genótipo L/L, associado a maiores produções de leite, e que as concentrações de IGF-1 eram maiores nos animais de genótipo L/V (LUCY et al., 1993; SORENSEN et al., 2002).

Schlee et al. (1994) também verificaram que o genótipo L/L estava associado a concentrações plasmáticas de GH mais elevadas do que nos genótipos L/V, enquanto a secreção de IGF-1 apresentava padrão inverso. Correlacionando a frequência dos alelos com o desempenho de machos da raça Simental, os autores obtiveram indicações de que o genótipo L/V (menores concentrações de GH e maiores concentrações para IGF-1) estaria associado com valores genéticos mais elevados para ganho de peso médio diário.

De acordo com Sorensen et al. (2002) a frequência de alelos entre as raças diferem. Animais da raça Holandesa possuem baixa frequência do alelo Val se comparados com animais da raça Jersey que, por sua vez, possui a mesma frequência entre os alelos Val e Leu. Entretanto, assim como na raça Holandesa, em Jersey, o genótipo Leu/Leu apresenta maior liberação de GH que o Val/Val, sendo o heterozigoto Leu/Val, apresentando liberação de GH intermediária.

No trabalho desenvolvido por Sorensen et al. (2002) a frequência do alelo Val em vacas holandesas foi de 0,07 contra 0,93 do alelo Leu. Os autores analisaram neste experimento 286 animais, encontrando 244 com genótipo Leu/Leu, 42 animais com o genótipo Leu/Val e 0 (zero) animais com genótipo Val/Val. Os resultados por eles apresentados estão dentro do esperado, pois a frequência genotípica do genótipo Val/Val para vacas Holandesas é de 0,005. Segundo os autores, a baixa frequência do genótipo Val/Val e a alta frequência do genótipo Leu/Leu podem ser explicadas através da severa pressão de seleção para animais de alto mérito genético em relação a produção de leite, sofrida pela raça

Holandesa durante todos estes anos. Segundo Zwierzchowski et al. (2002) a frequência do genótipo Val/Val é muito rara na raça Holandesa.

Em estudo realizado por Zwierzchowski et al. (2002), foram amplificados 428 pb que foram digeridos pela enzima Alu-1. Neste experimento, 177 animais da raça Holandesa foram analisados, tendo sido identificados 137 animais Leu/Leu, 36 animais Leu/Val e somente 4 animais Val/Val (cuja frequência foi de 0,02). Ao contrário do demonstrado por Lucy et al., (1993); Schlee et al. (1994) e Sorensen et al. (2002) os autores encontraram maior produção diária de leite, maiores quantidades de sólidos totais (gordura e proteína do leite) nos animais com genótipo Val/Val, quando comparados aos demais genótipos, não tendo sido encontrada diferença entre os animais de genótipo Leu/Leu e Leu/Val.

Sorensen et al. (2002) também estudaram o polimorfismo Alu-1 em raça Jersey, aplicaram GhRH para induzir a liberação de GH e observaram que animais Leu/Leu liberavam 57% mais GH do que animais pertencentes aos demais genótipos e que animais Leu/Val liberavam 53% mais GH que os Val/Val. Nos animais da raça Holandesa analisados pelos autores, não houve diferença na secreção do GH entre os genótipos Leu/Leu e Leu/Val.

Em estudo realizado por Grochowska et al. (2001), foram analisados bezerros da raça Friesian, os animais receberam hormônio liberador de tireotrofina para induzir a liberação de GH, os animais identificados com genótipo Leu/Leu apresentaram a menor concentração sanguínea de GH que animais dos demais genótipos.

A condução dos experimentos citados quanto ao uso de diferentes hormônios para induzir a liberação do GH, poderia estar provocando respostas diferentes quanto ao polimorfismo Alu-1. Mas, segundo os autores, a explicação mais provável para estas diferenças observadas para as diferentes raças estudadas, poderia estar relacionada a uma associação do gene do GH com outros genes que, por sua vez, agiriam de forma direta ou

indireta sobre a liberação e concentrações plasmáticas de GH, bem como com a modulação da ação do GH sobre seus receptores teciduais.

Pelo exposto, pode-se concluir que as variações nos níveis plasmáticos de GH poderiam ser utilizadas como um indicador do potencial produtivo e, conseqüentemente, incorporadas ao índice de seleção animal. Entretanto, os padrões plasmáticos de GH sofrem variações em função de uma série de fatores como estado fisiológico nível nutricional, meio ambiente, o que inviabiliza a utilização dessa variável nos programas de melhoramento genético. Contrariamente, o DNA dos indivíduos não está sujeito à variações, exceto aquelas decorrentes de processos naturais, que resultam nos chamados genes polimórficos, que podem e devem ser utilizados nos processos seletivos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 80 animais da raça Holandesa, no período entre parto até o pico de lactação, pertencentes a grupos com capacidade produtiva variável (média de produção de 15 a 45 kg leite), proveniente da fazenda Leite Forty.

4.1 COLETA DE AMOSTRAS E LOCAIS PARA REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES

As amostras de sangue foram colhidas por venipunctura da jugular esquerda, na região do pescoço, com seringas descartáveis em tubos *vacutainer* contendo solução de EDTA. Os tubos eram transportados sob refrigeração até o Laboratório de Andrologia do Depto. de Reprodução Animal da FMVZ-USP, sendo então centrifugados a 5.000 rpm (Centrífuga Eppendorff ® modelo 5417R, rotor Max 30 x 375 g Z 027 F45-30-11) por 10 minutos).

Após a centrifugação o plasma sobrenadante foi colhido e colocado em dois tubos *eppendorf* de 1,5 mL, na quantidade de aproximadamente 1,0 mL em cada, e posteriormente congelados em Freezer a -20°C até a realização das análises de IGF-I e progesterona.

Foi colhido anel de leucócito (camada “buffer coat”) com auxílio de pipetadores (Eppendorf®) e o mesmo foi então acondicionado em *eppendorf* de 1,5 mL e congelado à -20°C até se proceder à extração de DNA.

A extração de DNA das amostras de sangue, bem como as análises laboratoriais de amplificação do DNA, eletroforese e fotografia dos géis, foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia, do Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Sanidade Animal (VPS) da FMVZ-USP. A técnica de RFLP (“RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLIMORFISMS”) foi realizada no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da FMVZ-USP. Os níveis hormonais foram determinados no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do departamento de Reprodução Animal (VRA) da FMVZ-USP.

4.5 PROPRIEDADE UTILIZADA NO EXPERIMENTO

A Fazenda Leite Forty, localizada foi a propriedade escolhida para realização dos trabalhos referentes a este projeto de Tese de Doutorado.

A fazenda está situada na cidade de Mogi-Mirim, cuja a extensão é de 499,10 Km², latitude sul de 22°26'04'' e longitude oeste de 46°57'32'', a uma altitude de 632m, a 150 km da cidade de São Paulo. Com clima temperado quente, possui temperaturas anuais médias entre 16,3°C e 24,8°C, com umidade relativa do ar de 89%, com maior incidência de chuvas em fevereiro e menor em julho¹.

¹ Fonte: Fundação SEADE (1995) e Anuário de São Paulo (1994).

4.5.1 ESCOLHA DA PROPRIEDADE

A escolha se deu de acordo com às seguintes características: tratava-se de uma propriedade modelo, cujo rebanho possuía animais de alto mérito genético; ser uma propriedade altamente tecnificada e pelo fato de todos os animais estarem submetidos ao mesmo manejo nutricional, produtivo e reprodutivo.

As informações aqui apresentadas foram fornecidas pelos técnico responsável e gerente da propriedade Dr. José Carlos e Dr. Henrique, respectivamente, ambos médicos veterinários.

4.2.2 MANEJO PRODUTIVO

O rebanho era composto por 817 animais da raça Holandesa, na época possuía 342 vacas em lactação, com média de produção anual de 8.150 kg/vaca/lactação. Os animais eram procedentes principalmente do Paraná. Pretendiam atingir 1000 animais no rebanho, com 400 vacas em lactação.

Os animais eram divididos em lotes de acordo com o tempo de produção:

NÚMERO DO LOTE	TIPO ANIMAL	TEMPO DE PERMANÊNCIA
Lote 1	Novilhas de primeira cria	Até segundo parto
Lote 2	Vacas com 150 dias de paridas	Até secar
Lote 3	Vacas secas	Dia do parto
Lote 4	Vacas recém-paridas	1 semana do pós parto
Lote 5	Vacas	30 dias de paridas
Lote 6	Vacas	30 a 150 dias de paridas

Quadro 2- Divisão dos animais em lotes

As vacas com até 150 dias de lactação passavam por três ordenhas diárias, vacas acima de 150 dias de lactação passavam por duas ordenhas diárias até chegar o momento de secá-las. As vacas eram secas a partir dos 210 dias de gestação, ou quando a produção destas diminuía para 10 litros/dia.

A taxa de descarte no rebanho estava em torno de 30%. Os critérios considerados para descarte eram problemas crônicos de mastite e casco, baixa taxa de concepção, frequência de aborto sem causa aparente, animais com produção inferior a 10 kg de leite/dia, vacas que ao serem secas estavam vazias, entre outras, deveriam ser prontamente descartadas. O descarte por número de lactações não era procedimento adotado para o rebanho.

4.2.3 MANEJO NUTRICIONAL E REPRODUTIVO

A dieta dos animais era composta basicamente por farelo de soja, uréia, soja integral tostada, milho grão, polpa cítrica, refinazil®, caroço de algodão, cevada úmida, silagem de milho e feno de capim Rhodes. Todos os animais recebiam ração completa, mas a composição diferia entre os estágios produtivos em que o animal se encontrava, principalmente quanto a porcentagem de forragem, níveis de energia metabolizável (EM) e energia líquida (EL), porcentagem de NDT (nutrientes digestíveis totais), proteína bruta (PB) e suas frações (PD-proteína degradável e PND-proteína não degradável), e relação Ca/P (Quadro 3):

NUTRIENTES	CATEGORIA DE PRODUÇÃO		
	3 ORDENHAS (> 25 kg leite/dia)	2 ORDENHAS (12 a 25 kg leite/dia)	VACAS SECAS (< 12 kg leite/dia)
% Forragem na MS	34,70	44,10	40,10
E M (kcal/kg MS)	1,74	1,57	1,50
E L (kcal/kg MS)	1,70	1,52	1,42
NDT (% MS)	74,12	68,81	68,76
PB (% MS)	17,50	15,00	15,66
PD (% PB)	61,25	63,46	56,17
PND (%PB)	38,75	36,54	43,83
Cátion-ânion(meq/100g MS)	+ 26,40	+ 15,70	- 11,20
Ca/P	1,67	2,58	3,95

Quadro 3- Níveis de nutrientes de acordo com categoria de produção dos animais

A Dieta era regulada para uma ingestão diária em torno de 21 kg MS/vaca/dia.

A detecção de cio era feita por observação dos funcionários. Havia 5 rufões com bursal de tinta, empregado principalmente para novilhas. O veterinário responsável confirmou que se efetuava periodicamente exames para a verificação de agentes patológicos como *Herpesvirus ssp*, *Leptospira ssp*, *Campilobacter ssp*, *Trichomonas ssp*, *Brucelose*, como possíveis agentes responsáveis pelos casos de abortamento, mas que até aquele momento, nenhum destes agentes tinha sido isolados na propriedade.

4.2.4 MANEJO SANITÁRIO

Todos os animais adquiridos pela propriedade deveriam apresentar atestado sanitário para tuberculose, brucelose, raiva, leptospirose, aftosa, leucose, IBR, BVD, parainfluenza. Ainda assim eram mantidos em quarentena, além de obedecer esquema de vacinação usual para brucelose, febre aftosa, IBR,BVD, leptospirose, parainfluenza. A tuberculinização era realizada semestralmente. A vermifugação se dava três vezes ao ano.

Enfermidades mais comuns eram casco (6%) e mastite clínica (1,8%). Segundo o veterinário responsável: Dr. José Carlos, o maior problema a ser enfrentado na propriedade

tratava-se da Tristeza Parasitária Bovina, causada por *Babesia sp.* Durante o período experimental, dos 100 animais inicialmente empregados, 16 morreram devido a babesiose. Neste período, a babesiose ocorreu de maneira bastante severa, acometendo todo o rebanho e sendo responsável pela morte de vários animais, principalmente novilhas.

4.6 DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE DO GH

Os equipamentos utilizados para esta etapa foram: Centrífuga Eppendorff® (modelo 5417R, rotor Max 30 x 375 g Z 027 F45-30-11), Vórtex (Mistral mixer labline); Thermolyne® (type 16500 Dry-Bath), espectrofotômetro (Beckman DU®-640), termo-ciclador (marca PTC-200); Cuba Horizontal 11-14 e conjunto para eletroforese da GIBCO BRL) e máquina fotográfica digital (Kodak Digital Science™ DC 40 Camera).

a) EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE SANGUE:

O protocolo seguido está descrito abaixo:

1. Descongelar as amostras a temperatura ambiente e centrifugá-las (12000 rpm) por 5 minutos a temperatura de 10°C.
2. Descartar o sobrenadante, promovendo a primeira lavagem do pélete formado com 500 uL de TKM-1 (Tris HCl 1 M pH7,6 + KCl 1M + MgCl₂ 1M + EDTA 0,1M) e 20uL de Nonidet-P40 (Sigma®), uso de vórtex para destruir o pélete, centrifugação (6000 rpm por 5 minutos a temperatura de 10°C).
3. Repetir passo 2 (somente com TKM-1) cerca de 3 vezes ou até que o pélete formado apresentasse uma coloração bem clara.

4. Após a ultima lavagem, descartar o sobrenadante e acrescentar 200 uL de tampão TE (Tris HCl 1M pH 8 + EDTA 0,1 M) e 600 uL de Isotiocianato de Guanidina (GT), de acordo com protocolo descrito por (CHOMKZYNSKI, 1993).
5. Levar as amostras ao vórtex para destruir o pélete, e acrescentoar 100 uL de clorofórmio (vórtex novamente). Ceentrifugar por 5 minutos a 12000 rpm a temperatura de 10°C.
6. Pipetar cerca de 400 uL do sobrenadante de cada amostra (com cuidado para não pescar a matéria orgânica já separada) e acondicionar em novo eppendorf de 1,5 mL, acrescentando 600 uL de propanol (100 %) gelado.
7. Manter as amostras em “freezer” a temperatura de -20°C. As amostras foram acondicionadas em “freezer” a -20°C por pelo menos 2,5 horas ou “over nigh”, para precipitar ao máximo o DNA extraído.
8. Centrifugar as amostras por 15 minutos a 12000rpm a temperatura de 10°C, descartar o sobrenadante e acrescentar 500 uL de etanol 70%, promovendo nova centrifugação (20 minutos a 12000 rpm a temperatura de 10°C).
9. Descartar o sobrenadante e colocar as amostras no “Thermolyne” a 56 °C até evaporar todo o álcool e a água (cerca de 15 minutos).
10. Ressuspender o DNA em 50 uL de tampão TE permanecendo no “Thermolyne” por cerca de 30 minutos, para dissolver o DNA. A seguir, todos os tubos foram congelados em “freezer” a -20°C até se proceder a quantificação e amplificação.

b) QUANTIFICAÇÃO DO DNA:

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro utilizando-se alíquota de 10 µl de cada amostra em 990 µl TE, a 260-280 nm de comprimento de onda. $[DNA] = A_{260} \times 10^4 \times f_d = \mu g / mL$ ou $ng / \mu l$.

Neste experimento, a relação 260/289 nm de comprimento de onda ofereceu resultados de 1,87 em média, indicando que o DNA extraído possuía alto grau de pureza (relação ideal entre 1,8 e 2,0). Foi possível obter em média 700 ug/mL de DNA por amostra extraída, quantidade suficiente para realização da amplificação.

c) AMPLIFICAÇÃO DO DNA

Uma sequência de aproximadamente 404 pares de base, entre as posições 2054 e 2457, que compreende o 5º exon do gene do GH, foi amplificada por PCR, utilizando-se os iniciadores obtidos a partir da sequência sintetizada por GORDON et al. (1983).

As reações foram realizadas para um volume final de 50µl de reação, utilizando-se tubos de eppendorf de 0,5 mL, contendo 5 uL de DNA(100 ng), 1,6 µL de cada “ primer” (5 pmol/uL), 5uL (1x)PCR “buffer” com MgCl₂ [10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1,5mM MgCl₂ e 50 mM KCL], 4 uL de dNTPs (1,25 mM), 0,21 uL de Taq polimerase (0,5 U) e 32,59 uL de água MilliQ autoclavada. A reação de amplificação foi efetuada em termo-ciclador (para tubos de 500 uL) de acordo com a seguinte programação:

- 95°C por 60 segundos (desnaturação),
- 59°C por 80 segundos (“anelling”),
- 72°C por 90 segundos (extensão),
- repetindo-se os 3 passos cerca de 45 vezes.

d) ANÁLISE “RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLIMORFISMS”(RFLP)

No fragmento estudado existem 3 sítios de restrição para a Alu-1 que reconhece as seqüências AG↓CT (*primer forward*) e TC↑GA (*primer reverse*), sendo o polimorfismo identificado, quando existir, na posição 2141 de acordo com o mapa de restrição. Este fragmento também apresenta 3 sítios de restrição para a enzima Dde-1, que reconhecem as seqüências C↓TNAG (*primer forward*) e GANT↑C (*primer reverse*), sendo o polimorfismo identificado, quando existir, na posição 2291, como indicado na Figura 1. Os tamanhos dos fragmentos obtidos de acordo com os genótipos polimórficos observados estão demonstrados no Quadro 4.

Na Figura 7 apresenta um esquema referente ao tamanho dos sítios de restrição para as enzimas Alu-1 e Dde-1 no gene do GH:

Fonte: Adaptado de Yao et al. (1996).

Figura 7- Mapa de restrição para as enzimas Alu-1 e Dde-1

	Polimorfismo Dde-1			Polimorfismo Alu-1		
	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	-/-
Tamanho do fragmento (pb)*	192	349	349	185	236	236
	157	192	45	131	185	51
	45	157	9	51	131	37
	9	45		37	51	
		9			37	

*pb: pares de base

Fonte: Yao et al. (1996)

Quadro 4- Tamanho dos fragmentos obtidos de acordo com o genótipo polimórfico

Os produtos da digestão foram separados por eletroforese a 100 volts e 45 miliamper, com uso de TBE - 0,5 X em gel de agarose (2,0 %) para a identificação da presença de polimorfismo. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo (25 uL/ 500 mL de água destilada), fotografado e o tamanho dos fragmentos determinados pelo padrão de migração, utilizando como referência o padrão de peso molecular de 100 pb (GIBCO, BRL).

4.7 DOSAGENS DE IGF-1 E PROGESTERONA (P4)

Foram coletadas quatro amostras de sangue por animal (uma coleta por semana) para as dosagens de IGF-1 e P4. Os testes para ambos os hormônios foram realizados em duplicata, totalizando 640 análises para cada hormônio. Estas 640 análises foram divididas em 4 ensaios, sendo os coeficientes de variação intra-ensaio e os coeficientes de variação inter ensaios, bem como a sensibilidade do teste quanto a detecção das concentrações de IGF-1 (ng/mL de sangue) estão apresentados na tabela 1(IGF-1) e tabela 2 (P4).

Para as análises de IGF-1 foram utilizados Kits DSL 5600 ACTIVE ® (Empresa Diagnostic Systems Laboratories Inc-EUA). A concentração mínima de IGF-1 detectada por este Kit foi de 0,8 ng/mL de plasma. O controle do teste para verificação de sua sensibilidade e confiança é apresentado na tabela 1:

Tabela 1 - Confiabilidade do teste dos níveis de IGF-1 por RIA

Ensaio	Sensibilidade (ng/mL)*	CV Intra Baixo (%)	CV Intra Alto (%)
1	0,3	2,14	5,14
2	0,3	12,31	4,89
3	0,3	6,85	5,14
4	0,3	9,04	3,80
5	0,3	9,94	9,22
CV Inter (%)		8,26	5,59

*níveis de IGF-1 abaixo de 0,3 ng/mLs não foram detectados.

Os níveis de P4 foram medidos através de Kits comerciais (Active IGF-1 with extraction – DSL-56000). O controle do teste para verificação de sua sensibilidade e confiança está apresentado na Tabela 2):

Tabela 2 - Confiabilidade do teste dos níveis de progesterona por RIA

Ensaio	Sensibilidade (ng/mL)	CV Intra Baixo (%)	CV Intra Alto (%)
1	0,01 *	12,43	3,06
2	0,01 *	13,87	2,06
3	0,02 *	4,52	3,27
4	0,02 *	9,57	3,69
CV Inter (%)		3,40	0,12

*níveis de progesterona abaixo dos valores 0,01 e 0,02 ng/mL não foram detectados .

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO CORPORAL

Os escores corporais das vacas foram verificados durante 4 semanas após o parto, para avaliação do balanço energético negativo sofrido pelos mesmos, nos períodos de colheita das amostras de sangue. Valores de 1 a 5 para escore corporal foram atribuídos aos animais (Quadro 1 e Figura 3) e, aqueles que apresentaram escore entre 1 a 2,5 foram considerados magros, animais com escores de 3,0 a 3,5 foram considerados em boas condições corporais e animais com escore acima de 4,0 foram considerados acima do peso. As avaliações dos escores corporais foram realizadas sempre pelo mesmo observador.

4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Devido ao surto de babesiose que se tornou bastante severo a partir da metade final de junho de 2001, os animais foram divididos quanto ao tempo, sendo tempo 1 (animais que

emprenharam até meados de junho de 2001) e tempo 2 (animais que emprenharam ou não a partir da metade final de junho de 201) e foi adotado o Delineamento Experimental em Blocos ao Acaso (Quadro 5):

Grupo		Tempo	
1	2	1	2
1 e 2 lactações	3,4 e 5 lactações	1ª metade junho 2001	2ª metade junho 2001
45 animais	34 animais	24	56

*Número Total de Observações = 80 animais

Quadro 5 - Grupos experimentais:

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas as animais foram divididos em dois grupos, de acordo com o número de lactações.

O quadro da ANAVA para este experimento está apresentado no Tabela 3:

Tabela 3 - Análise de variância (ANAVA) para o experimento

Fontes de Variação	Graus de Liberdade (G°)
N	79
A- Ggenótipos	2
B- N° Lactações	1
C- Tempo	1
A x B	2
B x C	1
A x C	2
Resíduo	70

Os resultados de polimorfismo foram analisados pelo teste de Qui-Quadrado, para verificar se as frequências genótípicas estariam dentro do esperado, de acordo com a lei de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS Institute, 2000).

Através do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas foram transformados (logaritmo na base 10 - $\text{Log}_{10}X$; Raiz quadrada - $\text{RQ } X$; Quadrado - X^2) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Para descrição dos resultados, foram empregados os desvios padrões e as médias (média $\pm$ desvio padrão da média) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis.

O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta. As variáveis classificatórias utilizadas foram genótipo (LL, LV, VV) e número de partos (Grupo 1 e Grupo 2). As variáveis resposta avaliadas foram dias em aberto (DEA), produção de leite na lactação (kg), produção de leite no pico de lactação; níveis plasmáticos de IGF-1 (ng/mL) e níveis plasmáticos de progesterona (ng/mL) e escore corporal.

As variáveis respostas foram analisadas através da correlação de Pearson (PROC CORR), sendo os resultados expressos através do coeficiente de correlação de Pearson (r) e seu nível de significância (p).

Na análise de variância foram verificados os efeitos das variáveis classificatórias genótipo (+/+; +/- e -/-) do número de partos (Grupo 1 e Grupo 2), e a interação entre genótipos (+/+; +/- e -/-) e Grupos (1 e 2).

As variáveis: produção de leite na lactação (kg) e produção de leite no pico de lactação, obedeceram às premissas e a normalidade dos resíduos, não sendo necessário transformações. Para elas utilizou-se a análise de variância com Teste de Tukey. As variáveis respostas níveis plasmáticos (ng/mL) de progesterona e IGF-1 (ng/mL) e DEAs não obedeceram a normalidade dos resíduos, sendo a mesma obtida através da transformação para o logaritmo de seus valores na base 10.

A variável resposta: escore corporal não obedeceu às premissas, não sendo possível transformá-la. Esta variável foi então analisada através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Neste caso utilizou-se o nível de significância do teste Wilcoxon.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito de grupo (número de lactações) para nenhuma variável resposta estudada neste experimento, bem como não foram verificadas interação da variável número de lactações com as demais variáveis classificatórias (genótipo e tempo).

5.1 QUANTO AOS ESCORES CORPORAIS OBTIDOS

Os escores corporais foram medidos semanalmente, durante um mês, logo após o parto, para acompanhar o período no qual o Balanço Energético Negativo poderia ser mais severo.

Tempo	Nº Observações	D 0	D4	Média
1	24	2,9	2,6	0,3
2	56	2,9	2,5	0,4

Número de Observações = 80

Quadro 6: Escore médio para os dois tempos experimentais no momento do parto (D0), na semana 4 (D4) e perda média de escore no período.

A perda de condição corporal parece ser responsável pelo retardamento da atividade cíclica ovariana, sendo sua medição importante ferramenta para relacionar desempenho reprodutivo com nível nutricional em vacas no início da lactação (BARUSELLI et al., 2001; BUTLER, 2000; BUTLER, SMITH, 1989; CHALUPA et al., 1996; FERGUNSON, 1996; ROCHE, et al., 2000; SNYDER et al, 2000; STUDER, 1998).

Vários autores citam que o escore corporal de vacas leiteiras no momento do parto deve estar entre 3,0 – 3,5 e que estes animais não devem atingir escore corporal igual ou menor que 2,5 durante os primeiros 30 dias do pós-parto (fase em que, segundo a literatura, o BEN é mais severo) sob pena de diminuição da produção de leite e menor eficiência reprodutiva (menor intervalo a primeira ovulação e redução na fertilidade) (BUTTLER, 2000; CHALUPA et al., 1996; LOEFFLER et al., 1999; STUDER, 1998).

Os extremos da condição corporal (obesidade e a caquexia) no peri parto predispõem a vaca leiteira a distúrbios de saúde, reprodutivos e produtivos. De acordo com os autores citados, quanto maior é a perda de escore corporal após o parto, menor será a taxa de concepção. Por outro lado, segundo Chalupa et al. (1996) e Studer (1998), animais que chegam ao parto com condição corporal baixa ($\leq 2,5$), podem apresentar cistos ovarianos associados a anestro prolongado. Quanto aos níveis produtivos, a literatura demonstra que animais que chegam ao parto com condição corporal entre 3,0 – 3,5 podem produzir cerca de 55 kg de leite/ dia a mais em relação àqueles que parem em menor condição corporal

Neste experimento observa-se que os animais, em geral, não pariram em condições corporais adequadas (média de 2,9). Embora a perda de escore tenha sido pequena (0,3 para animais do tempo 1 e 0,4 para animais do tempo 2), os níveis foram em média de 2,5 para ambos os grupos na quarta semana de medição (30 dias do pós-parto). Baseado na literatura, a condição corporal ao parto e aos 30 dias poderia ter influenciado na longa duração dos dias em aberto (DEAs) apresentados pelos animais em questão, apresentados no Quadro 7.

6.2 QUANTO AOS DADOS PRODUTIVOS E REPRODUTIVOS

No quadro 7 estão apresentados os resultados médios de desempenho produtivo e reprodutivo obtidos pelos animais:

Tempo	Produção na Lactação (kg)			Pico de Produção (kg)			Dias em Aberto		
	Média	> valor	< valor	Média	> valor	< valor	Média	> valor	< valor
1	6000	9413	600	30,4	54,2	8	86	105	41
2	6933	11431	1270	33,3	79,8	9	296	378	137

Tempo1 = 24 animais Tempo 2 = 56 animais

Quadro 7 - Média, maiores e menores valores obtidos para produção na lactação, pico de produção e dias em aberto para os tempos 1 e 2.

De acordo com a literatura, o perfil ideal de uma vaca de alta produção de leite poderia ser resumido da seguinte maneira: a condição corporal ao parto deve estar entre 3,0 – 3,5, o intervalo entre parto/ 1º cio deve ser de 10 a 30 dias; a inseminação deve ocorrer 60 dias do pós parto e aos 85 dias (30-110) do pós parto deverá estar prenhe (DEAs de 85 dias), considerando número de serviços a concepção de no máximo 2, para apresentar intervalo entre partos de 12 a 14 meses. Este animal deve ter uma lactação de 305 dias, período seco de 60 dias para melhor se preparar para o próximo parto (BARUSELLI et al., 2001; BRIER, GLUCKMAN, 1991; BUTLER, 2000; BUTLER, SMITH, 1989; CHALUPA et al., 1996; DISKIN et al., 2003; FERGUNSON, 1996; ROCHE, et al., 2000; SNYDER et al, 2000; STUDER, 1998).

Neste experimento, os animais chegaram ao parto em condição corporal inadequada, como discutido anteriormente. O intervalo entre parto primeiro cio em média foi de 44,4 dias (acima do ideal, mas ainda razoável, uma vez que em sua revisão, Butler (2000) cita que o intervalo entre parto-cio em vacas Holandesas pode variar de 10 a 110 dias).

Os animais do tempo 1 apresentaram DEAs, que correspondem ao intervalo entre parto/concepção, de 86 dias, corroborando com a literatura. Já os animais do tempo 2 apresentaram em média 298 DEAs, aquém do preconizado pela literatura (BARUSELLI et al., 2001; BRIER, GLUCKMAN, 1991; BUTLER, 2000; BUTLER, SMITH, 1989; CHALUPA et al., 1996; DISKIN et al., 2003; FERGUNSON, 1996; ROCHE, et al., 2000 ; SNYDER et al, 2000; STUDER, 1998).

Quanto aos demais dados analisados, têm que dos 80 animais empregados, ao final da coleta de dados, 37 não haviam emprenhado 15 meses (intervalo entre partos acima de 400 dias) após o último parto. O número de serviço por concepção girou em torno de 3,8, a média de dias em lactação obtido para o rebanho foi de 297 dias.

Portanto, os indicadores de eficiência reprodutiva para os animais analisados se apresentaram muito baixos em relação a literatura, indicando que o desempenho reprodutivo destes animais estava muito reduzido devido a um longo período de anestro.

Segundo Butler (2000); Butler, Smith (1989) e Diskin et al. (2003); a duração do anestro pós-parto é influenciado por fatores ambientais, genéticos, fisiológicos e metabólicos, incluindo diferenças entre raças, nível nutricional, amamentação, potencial genético para produção de leite e estado imunológico (enfermidades intercorrentes).

No presente experimento, fatores ambientais e raciais estariam exercendo pouco, ou nenhum efeito sobre as características reprodutivas, uma vez que os animais eram manejados da mesma maneira, o ambiente era adequado para criação deste tipo de rebanho e os animais eram todos da mesma raça, selecionados para alto mérito genético de produção.

Segundo a Butler (2000) a estratégica dietética para vacas de alta produção, com alta inclusão protéica (17 a 19%), embora estimule a produção de leite, também estaria relacionada a uma menor performance reprodutiva, devido a ação dos altos níveis de uréia (resultante da degradação protéica no rúmen) sobre o ambiente uterino. Neste experimento, os

animais no início da lactação recebiam 17,5% de proteína diariamente (Quadro 3). Esta poderia ser uma das explicações para o baixo desempenho reprodutivo, se os animais do tempo 1 tivessem apresentado longos períodos de DEAs, o que não ocorreu.

Por outro lado, deve-se ressaltar que o rebanho, de maneira geral, foi acometido por Tristeza Parasitária Bovina (por *Babesia sp*), desenvolvendo quadros severos, principalmente as novilhas de primeira cria, tendo ocorrido muitas mortes na propriedade. Pode-se observar esta informação, se considerar os animais do tempo 1, que apresentaram indicadores próximos aqueles descritos na literatura.

É provável, que em face ao grau de seleção para produção de leite, e as diversidades enfrentadas quanto a babesiose, os animais do tempo 2 metabolicamente priorizaram energia para manutenção do potencial produtivo, em detrimento da reprodução. Além disso, os animais apresentaram alta produção de leite no pico, com médias acima de 30 kg de leite/dia (Quadro 7) e embora eles não tenham tido perda significativa de condição corporal, acredita-se que os mesmos tenham sofrido com o BEN, pois pariram em condições corporais não adequadas (média de 2,9), conforme quadro 7.

De acordo com Gong et al. (2002), nos últimos 25 anos, observa-se que a taxa de concepção em rebanhos americanos de alta produção vem diminuindo de 0,5 a 1% ao ano. Este declínio, segundo os autores, tem sido atribuído ao menos em parte, a intensa seleção genética sobre as características produtivas destes animais, sem compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos. Para os autores, a maior demanda energética para manter os altos níveis produtivos é fator intimamente envolvido no declínio do desempenho reprodutivo de vacas leiteiras e isso poderia explicar, em parte, os resultados obtidos por este experimento, por outro lado, não se pode ignorar o efeito da babesiose sobre os DEAs dos animais do tempo 2.

6.3 QUANTO AOS NÍVEIS DE IGF-1

Na tabela 3 estão descritos os níveis de IGF-1 encontrados para os animais durante as quatro semanas de observação:

Tabela 3 - Efeito da semana sobre os níveis plasmáticos de IGF- 1 para os 58 animais:

SEMANA	OBSERVAÇÕES	MÉDIA*	PADRÃO DA MÉDIA
1	60	47.7886034 ^{ab}	5.8453965
2	60	39.9719310 ^a	5.6741390
3	60	43.0835345 ^{ab}	5.1661271
4	60	55.4006379 ^b	5.6213321

*Letras diferentes indicam que houve diferença entre as médias para $p < 0,05$

Como foi verificado o efeito de semana sobre a variável níveis plasmáticos de IGF-1, foi necessário escolher uma semana para a realização dos demais testes estatísticos. Como a semana 4 foi a que apresentou maiores concentrações deste hormônio, a mesma foi escolhida para as demais análises.

Vários trabalhos na literatura sugerem que a função do IGF-1 circulante é principalmente de adaptação metabólica. Quando a vaca leiteira está em déficit energético, a resistência dos receptores periféricos ao GH, permitiria um declínio na produção de IGF-1 hepático, reduzindo seus níveis plasmáticos, juntamente com alteração da distribuição do IGF-1 em suas proteínas transportadoras. Essa diminuição do IGF-1 vem acompanhada de um aumento do catabolismo, conservando as proteínas para funções biológicas essenciais, aumentando a mobilização do tecido adiposo e, conseqüentemente, elevando os níveis plasmáticos de NEFAs (BREIER, GLUCKMA, 1991; MONGET, BONDY, 2000; MONNIAUX et al., 1997).

Na tabela 4 abaixo, podemos observar o efeito do tempo sobre os níveis de IGF-1 para os 60 animais analisados:

Tabela 4 - Efeito do tempo sobre os níveis plasmáticos de IGF-1 (ng/mL)

Tempo	Média dos níveis de IGF-1 (ng/mL)*	P
1	84,00 ± 10,21 ^a	0,0001
2	43,42 ± 6,69 ^b	

*Letra diferentes indicam que houve diferença entre as médias para $p < 0,05$

Segundo Burton et al. (1994), os níveis plasmáticos de IGF-1 gira em torno de 100 ng/mL, em animais adultos, sadios e não passando por estresse metabólico, devido ao déficit energético, por exemplo. Em trabalho realizado por Gong (2002), os níveis de IGF-1 encontrados para animais de alto mérito genético (acima de 4000kg leite) foi de 116,1 ng/mL e para os de menor mérito genético foi de 165,4 ng/mL.

Neste trabalho, os níveis de IGF-1 plasmáticos foram em média de 84 ng/mL nos animais pertencentes ao tempo 1 e de 43,42 ng/mL para os animais pertencentes ao tempo 2, resultados estes que corroboram com aqueles apontados por Burton et al. (1994) e Gong (2002).

Considerando que os animais deste experimento eram de alto mérito genético para produção, a diferença entre os níveis plasmáticos dos mesmos ($p=0,0001$) reflete o efeito de tempo.

A literatura sugere que a diminuição das concentrações plasmáticas de IGF-1 pode ser um importante mecanismo para a adaptação metabólica durante fases de déficit energético, sendo que a ação do IGF-1 pode ou não sofrer alterações nestas situações, dependendo de qual ação específica precisará ser preservada naquele momento (produção ou reprodução).

Considerando-se que fatores como presença de enfermidade, estado imunológico podem produzir efeito negativo sobre as variáveis relativas a produção e reprodução,

(DISKIN et al., 2003; GONG, 2002; ROCHE et al. 2002), a diferença dos níveis de IGF-1 encontrada entre os dois tempos experimentais pode ser explicada pelo severo quadro de Tristeza Parasitária que os animais do tempo 2 sofreram durante o período experimental .

6.4 QUANTO AOS NÍVEIS DE PROGESTERONA (P4)

O efeito da semana de coleta sobre os níveis plasmáticos de progesterona (P4) para os 60 animais utilizados estão apresentados na tabela 5:

Tabela 5 - Efeito da semana sobre os níveis de P4 para os 58 animais

SEMANA	OBSERVAÇÕES	MÉDIA*	PADRÃO DA MÉDIA
1	60	0.1679655 bc	0.0948580
2	60	0.0901483 c	0.0457441
3	60	0.4552466 b	0.1181373
4	60	1.2864914 a	0.2039869

*Letras diferentes indicam que houve diferença entre as médias para $p < 0,05$

Como foi verificado o efeito de semana sobre a variável níveis plasmáticos de P4, foi necessário escolher uma semana para a realização dos demais testes estatísticos. Como a semana 4 foi a que apresentou maiores concentrações deste hormônio, a mesma foi escolhida para as demais análises.

Observa-se através da Tabela 5 que os níveis de P4 foram menores durante as três primeiras semanas do pós-parto. Estes resultados corroboram com aqueles apresentados por Breier, Gluckman (1991); Butler (2000); Spicer et al. (1990); Thatcher et al. 2001 e Yung et al. (1996), que afirmam que vacas que estejam em déficit energético, apresentam baixos níveis

de progesterona nos três ciclos ovulatórios, podendo apresentar anestro prolongado, acima dos 110 dias encontrados na literatura

Em trabalho realizado por Thatcher et al. (2001) foram analisados 543 vacas no pré-parto até o pico de lactação. Dentre vários fatores, os autores mediram os níveis plasmáticos de P4 nos dias 51 e 63 do pós parto (período em que já se espera uma retomada da atividade ovariana) e observaram que 23,4% permaneciam em anestro 65 dias após o parto. Os autores consideraram níveis de P4 iguais ou inferiores a 1 ng/mL como indicativo de anestro.

Tabela 6 - Efeito do tempo sobre os níveis plasmáticos de P4 (ng/mL)

Tempo	Média dos níveis de P4 (ng/mL)*	P
1	1,87 ± 0,38 ^a	0,015
2	0,94 ± 0,21 ^b	

*Letras diferentes indicam que houve diferença entre as médias para $p < 0,05$

Os animais do tempo 1 apresentaram níveis de P4 de 1,87 ng/mL, enquanto os animais do tempo 2 apresentaram níveis de P4 de 0,94 ng/mL. Estes resultados, somados àqueles apresentados no quadro 7 quanto aos DEAs apresentados pelos dois grupos (88 dias e 290 dias, respectivamente), indicam que os animais do tempo 2 apresentaram um anestro pós-parto prolongado, devido também aos baixos níveis de P4 (<1 ng/mL) apresentados por estes animais, corroborando com os estudos de Thatcher et al. (2001).

A diferença dos níveis de P4 encontrada entre os dois tempos experimentais pode ser explicada, assim como quanto aos níveis de IGF-1 discutidos anteriormente, pelo severo quadro de Tristeza Parasitária que os animais do tempo 2 sofreram durante o período experimental .

Os níveis plasmáticos e intrafolicular de P4 estão positivamente correlacionados com os níveis de IGF-1 (R^2 0,3 e $p = 0,01$) (BREIER, GLUCKMAN, 1991; BUTLER, 2000;

LUCY et al., 1992; SPICER et al., 1990; TATCHER, 2001;; YUNG et al, 1996). Neste experimento os níveis de IGF-1 (Tabela 4), bem como de P4 (Tabela 6) se apresentaram baixos para os animais do tempo 2, sendo responsáveis pelo longo período de DEAs (290 dias/ Quadro 7) concordando com os resultados descritos na literatura.

6.5 POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DO FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO DO GENE DO GH COM Alu-1

A figura 8 apresenta o padrão de bandas para os genótipos encontrados para a enzima Alu-1. Os homozigos (+/+), representados pela indicação 4 na figura abaixo, apresentam dois fragmentos, um com 185 pares de base (pb) e outro com 131 pb. Os heterozigotos (+ / -), representados pela indicação 5 na figura abaixo, apresentam três fragmentos, um de 236 pb, um de 185 pb e outros de 131 pb. O polimorfismo observado em relação aos sítios de restrição da enzima Alu-1 correspondem aos alelos Leu/Val identificados por Lucy et al. (1991), que diferem com respeito a um aminoácido Leucina ou valina na posição 127. O alelo correspondente ao aminoácido Leucina apresenta o sítio de restrição da enzima e é dividido em dois fragmentos (+), enquanto o alelo correspondente ao Valina apresenta apenas um fragmento (-). O genótipo Val/Val apresenta uma única banda de 236 pb. Neste experimento, não foram identificados animais com genótipo Val/Val para a enzima Alu-1. A identificação 6 na figura abaixo, foi obtida através da análise de um animal que não pertencia a este grupo experimental, apenas a título de ilustração.

Neste experimento não foi identificados nenhum animal com o Genótipo (-/-) ou Val/Val, sendo esta amostra (6) pertencente a outro animal, apresentado aqui apenas como forma ilustrativa. (+) Presença de sítio de restrição para a enzima Alu-1. (-) Ausência do sítio de restrição para a enzima Alu-1.

Figura 8 – Apresentação das bandas dos genótipos para a enzima Alu-1.

A tabela 7 abaixo apresenta dos dados obtidos quanto às frequências genótípicas e alélicas para a enzima Alu-1, dos 60 animais analisados:

Tabela 7 - Frequências absolutas, genotípica e alélicas com relação ao tamanho do fragmento de restrição da enzima Alu-1

Enzima	Frequência Absoluta			Frequência Genotípica			Frequência Alélica	
	+ / +	+ / -	- / -	+ / +	+ / -	- / -	p	q
ALU-1	51	9	0	0,86	0,14	0	0,93	0,07

(+) Presença do sítio de restrição para a enzima Alu-1; (-) ausência do sítio de restrição para a enzima Alu-1.

Pode-se observar na tabela 7 que a frequência genotípica para Val/Val foi igual a zero, resultado este que concorda com trabalhos realizados por Sorensen et al. (2002); Zwierzchowski et al. (2002); Schlee et al. (1994), Lucy et al. (1993), que concluíram que a

freqüência do genótipo Val/Val é muito rara em rebanhos selecionados para alta produção de leite (freqüência gênica esperada de 0,005 para este genótipo).

No presente trabalho foram analisados 60 animais, tendo sido encontrados 51 animais Leu/Leu, 9 animais Leu/Val e zero animais Val/Val. A freqüência encontrada para o alelo Val foi de 0,07 e para o alelo Leu foi de 0,93. Estes resultados foram os mesmos encontrados em experimento realizado por Sorensen et al. (2002), que ao analisarem 286 animais da raça Holandesa, identificaram 244 animais com genótipo Leu/Leu; 42 animais Leu/Val e 0 (zero) animais Val/Val, apresentando freqüência alélica 0,07 para Val e 0,93 para Leu.

Trabalhos na literatura sugerem que a baixa freqüência do alelo Val/Val e a alta freqüência do alelo Leu poderiam ser explicadas através da severa pressão de seleção para animais de alto mérito genético para produção de leite, sofrida pela raça Holandesa durante todos estes anos (SORENSEN et al. 2002; ZWIERZCHOWSKI et al., 2002).

Na Tabela 8 estão descritos os efeitos de tempo e genótipo sobre as variáveis DEAs, produção de leite na lactação (kg) e produção de leite ao pico (kg). Não houve interação das variáveis classificatórias (tempo e genótipo) sobre as variáveis resposta em questão.

Tabela 8 - Efeito do genótipo sobre os dias em abertos (DEA), produção de leite (kg) na lactação e produção de leite no pico de lactação (kg)

Variável Resposta	Médias e Erro Padrão Genótipos Alu-1		p	Tempos Experimentais		p
	Leu/Leu	Leu/Val		1	2	
DEAs	234,78 ± 16,68	199,66 ± 39,95	0,49	88 ± 3,8 ^a	305 ± 11,6 ^b	0,0001
Lactação (kg)	6951,69 ± 344,3 ^a	4694,22 ± 968,31 ^b	0,016	5946 ± 639	6972 ± 387	0,15
Pico (kg)	34,38 ± 1,6	26 ± 4,8	0,056	30,34 ± 3,31	34,62 ± 2,05	0,19

Letras diferentes indicam que houve diferença estatística para $p < 0,05$

De acordo com a análise de variância, não houve efeito dos genótipos sobre os dias em aberto (DEA). Houve efeito de genótipo sobre a produção na lactação (kg), podendo ser observado que animais com genótipo Leu/Leu apresentaram maior produção de leite (LL =

6951,69 kg e LV = 4694, 22 Kg). Embora não tenha sido possível demonstrar efeito do genótipo sobre a produção no pico de lactação (kg), observou-se tendência ($p=0,056$) de maior nível de produção ao pico de lactação para animais com genótipo LL (34,38 Kg) em relação ao LV (26 kg). Não houve efeito de tempo para as variáveis produção na lactação (kg) e pico de produção(Kg)

Quanto a produção de leite, estes resultados corroboram com aqueles obtidos em trabalho realizado por Lucy et al. (1993); Lucy et al. (1991); Schlee et al. (1994);Sorensen et al. (2002), Leu/Leu produzem mais leite que animais Leu/Val, devido provavelmente as maiores concentrações plasmáticas de GH apresentados pelos primeiros. Concluíram também que animais Leu/Val teriam maiores níveis de IGF-1 que animais Leu/Leu, e segundo Schlee et al. (1994) isso estaria associado a valores genéticos mais elevados para ganho de peso médio diário (ver Tabela 13-Correlações).

Quanto aos DEAs, esperava-se que animais com Leu/Val, por apresentarem, segundo a literatura, maiores níveis de IGF-1, demonstrassem um retorno a atividade reprodutiva e, conseqüentemente a concepção, mais precoce que animais dos demais genótipos (LUCY et al., 1993; SCHLEE et al., 1994; SORENSEN et al., 2002). No presente trabalho, não foi possível demonstrar os efeitos dos genótipos sobre a variável DEAs. Acredita-se que se não houvesse ocorrido o surto de babesiose, isso poderia ter sido demonstrado.

Por outro lado, foi possível observar efeito do tempo sobre a variável DEAs. Assim sendo, animais do grupo 1, que conceberam antes do aparecimento do surto de tristeza parasitária (meados de junho) apresentaram DEAs em media de 88 dias contra 305 dias observados para o tempo 2. Estes resultados indicam que a enfermidade foi fator relevante para o longo período de anestro apresentado pelos animais.

Na tabela 9, observa-se os resultados do efeito dos genótipo e tempo sobre os níveis plasmáticos de P4 (ng/mL) e IGF-1 (ng/mL) e perda de escore corporal (EC). Não houve

interação entre as variáveis classificatórias (genótipo e tempo) para as variáveis resposta em questão.

Tabela 9 - Efeito do genótipo e do tempo sobre os níveis plasmáticos de P4 (ng/mL) e de IGF-1 (ng/mL) e perda de escore corporal (EC)

Variável Resposta	Genótipo		p	Tempo		p
	Leu/Leu	Leu/Val		1	2	
P4 (ng/mL)	1,19 ± 0,2	1,68 ± 0,6	0,64	1,86 ± 0,4 ^a	0,94 ± 0,2 ^b	0,01
IGF-1(ng/mL)	56,39 ± 6,5	64,61 ± 18,4	0,6	84 ± 10,2 ^a	43,42 ± 6,6 ^b	0,0001
Perda de EC	0,36 ± 0,04	0,33 ± 0,13	0,79	0,31 ± 0,05	0,38 ± 0,05	0,36

Letras diferentes indicam que houve diferença estatística para $p < 0,05$

Segundo a literatura, animais de alto mérito genético para a produção de leite, possuem genótipo Leu/Leu, seriam animais que apresentariam altos níveis de GH, menores níveis de IGF-1 e perda de escore corporal nas primeiras semanas do pós-parto. O menor nível de IGF-1 estaria relacionado a uma menor atividade ovariana e uma menor produção de progesterona (BREIER, GLUCKMAN, 1991; BUTLER, 2000; LUCY et al., 1992; SPICER et al., 1990; TATCHER, 2001; YUNG et al., 1996)

No presente trabalho, não foi possível provar efeito de genótipo sobre os níveis de P4 ($p = 0,64$). Porém, observou-se efeito de tempo, no qual, animais do tempo 1 apresentaram maiores níveis de P4 (1,86 ng/mL) que animais do tempo 2 (0,94 ng/mL). Estes resultados já foram discutidos anteriormente (Quadro 7 e Tabela 6)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, apesar de o genótipo Leu/Val ter apresentado níveis de IGF-1 maiores (64,61 ng/mL) em relação ao Leu/Leu (56,39 ng/mL), não foi possível demonstrar diferença estatística ($p = 0,6$). Quanto ao tempo, foi possível demonstrar que animais do tempo 1 apresentaram níveis de IGF-1 (84,10 ng/mL) significativamente maiores ($p = 0,0001$) que animais do tempo 2 (43,42 ng/mL). Resultados estes já discutidos anteriormente (Quadro 7 e Tabela 6).

Um menor nível de IGF-1 estaria relacionado a uma menor atividade ovariana e uma menor produção de progesterona, o que levaria a um maior período de anestro (BREIER, GLUCKMAN, 1991; BUTLER, 2000; LUCY et al., 1992; SPICER et al., 1990; TATCHER, 2001; YUNG et al, 1996). Neste experimento, os menores níveis de IGF-1 estiveram correlacionados com um menor nível de P4 ($R^2 = 0,28$ e $p = 0,01$), corroborando com a literatura.

Sorensen et al.(2002); Schlee et al. (1994); Lucy et al. (1993), observaram que animais selecionados para alto mérito de produção de leite apresentam genótipo Leu/Leu, possuindo maiores níveis de GH que, devido sua atividade lipolítica, contribuiria para que animais em BEN nas primeiras quatro semanas do pós-parto, mobilizassem mais gordura corporal para atender a baixo nível de ingestão de matéria seca e, conseqüentemente, perdessem mais escore corporal (BUTLER, 2000; ROCHE et al., 2000; SNYDERS et al., 2000; STUDER, 1998; CHALUPA et al.; 1996; FERGUNSON, 1996; BETLER, SMITH, 1989).

Os animais, como discutido anteriormente, pariram em escore corporal inadequado (2,9) e talvez essa seja a explicação para a pouca perda de escore corporal durante o experimento. De acordo com o teste de Wilcoxon, no presente trabalho não houve efeito de genótipo para perda de escore corporal, mas pode-se observar uma tendência ($p = 0,79$) de que animais Leu/Leu apresentasse maior perda de escore corporal (0,36) em relação aos animais Leu/Val (0,33), o que estaria corroborando com os resultados observados na literatura.

6.6 POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DO FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO DO GENE DO GH COM Dde-1

A figura 9 apresenta o padrão de bandas para os genótipos encontrados para a enzima Dde-1. Os homozigos (+/+), representados pela indicação 4 na figura abaixo, apresentam dois fragmentos, um com 192 pares de base (pb) e outro com 157 pb. Os heterozigotos (+/-), representados pela indicação 5 na figura abaixo, apresentam três fragmentos, um de 349 pb, um de 192 pb e outros de 157 pb. Os homozigotos (-/-), representados pela indicação 6 na figura abaixo apresentam 349 pb. O polimorfismo em relação aos sítios de restrição para a enzima Dde-1, segundo Yao et al. (1996) é determinado pela mutação A → C na posição 2291 (quinto exon do gene), e não implica em nenhuma mudança no aminoácido codificado (arginina).

(+) Presença de sítio de restrição para a enzima Dde-1. (-) Ausência do sítio de restrição para a enzima Dde-1
Figura 9 – Apresentação das bandas dos genótipos para a enzima Dde1.

Na tabela 10 estão apresentadas as frequências alélicas e genotípicas para os sítios de restrição da enzima Dde-1:

Tabela 10 - Frequências absolutas, genotípica e alélicas com relação ao tamanho do fragmento de restrição da enzima Dde-1

Enzima	Frequência Absoluta			Frequência Genotípica			Frequência Alélica	
	+ / +	+ / -	- / -	+ / +	+ / -	- / -	p	q
DDE-1	35	13	10	0,60	0,23	0,17	0,71	0,29

(+) Presença do sítio de restrição para a enzima Dde-1; (-) ausência do sítio de restrição para a enzima Dde-1.

Pode-se observar que para enzima Dde-1 foram encontrados os três genótipos possíveis indicando que a população estudada estava em equilíbrio de acordo com a Lei de Hardy-Weinberg. Não foram encontrados na literatura tantos trabalhos com a enzima Dde-1 como foram para a Alu-1.

De acordo com Yao et al. (1996), a presença do genótipo + / - estaria associada a uma maior produção de leite, além de gordura e proteína do leite em vacas de alto mérito para produção leiteira. Segundo os autores, este genótipo também estaria associado a uma maior liberação de GH e IGF-1 nestes animais.

Em trabalho realizado por Maranhão (2000), encontrou-se frequência gênica para +/+ de 0,28; para +/- de 0,50 e para -/- de 0,22 em rebanho Caracu Caldeano, com frequência alélica (+) de 0,527 e (-) de 0,473, demonstrando que os alelos estariam bem distribuídos nesta população. No presente trabalho, as frequências alélicas foram bem diferentes, tendo sido encontrado para (+) 0,71 e para (-) 0,29. Não houve efeito de número de partos (efeito de grupo) sobre nenhuma variável estudada para a enzima de restrição DDE-1.

Na tabela 11 pode-se observar o efeito do genótipo para as variáveis DEAs, produção de leite na lactação (kg), produção de leite ao pico (kg). Não houve interação entre as variáveis classificatórias genótipo e tempo sobre DEAs, produção de leite na lactação(kg) e

produção de leite ao pico (kg), bem como não foi observado efeito de tempo sobre as variáveis respostas em questão.

Tabela 11 - Efeito do genótipo sobre os dias em abertos (DEA), produção de leite (kg) na lactação e produção de leite no pico de lactação (kg)

Variável Resposta	Médias e Erro Padrão Genótipos Alu-1			p	Tempos Experimentais		p
	+ / +	+ / -	- / -		1	2	
DEAs	229± 19,5	226,9±33,1	224,7±38,5	0,98	88 ± 3,8 ^a	303 ± 11 ^b	0,0001
Lactação (kg)	6719 ± 442	6528± 722	6967±676	0,91	5946 ± 639	7131 ± 361	0,08
Pico (kg)	34,92 ± 1,7	32,19 ± 4,2	30,54 ± 2,7	0,52	30,34 ± 2,3	35,28 ± 1,9	0,12

Letras diferentes indicam que houve diferença estatística para $p < 0,05$

De acordo com a análise de variância, não houve efeito do genótipo sobre os dias em aberto (DEA) e produção de leite na lactação (Kg) e para produção de leite ao pico (kg).

Observou-se efeito de tempo sobre os DEAs, mostrando que animais do tempo 1 apresentaram DEAs menores (88 dias) que animais do tempo 2 (303). Estes resultados já foram discutidos anteriormente. Poucos trabalhos na literatura investigaram os efeitos do polimorfismo da Dde-1, seja em gado de corte, seja em gado leiteiro. Mas, encontra-se descrição de que animais de alto mérito genético (YAO et al.,1996) para produção de leite ou que sofreram grande pressão de seleção como animais Caracu Caldeano (MARANHÃO, 2000), apresentam alta frequência do genótipo +/-.

No presente experimento, não foi possível demonstrar o efeito do genótipo sobre nenhuma das três variáveis estudadas. Talvez, elevando o número de observações e diminuindo a influência do meio ambiente (principalmente quanto ao controle de doenças), poderíamos obter melhores respostas. Ou ainda, o polimorfismo da Dde-1 seja um marcador que melhor caracteriza animais mestiço ou de dupla aptidão. Estudos neste sentido poderiam ser conduzidos para melhor compreensão deste marcador.

Na tabela 12 apresenta-se o efeito do genótipo e do tempo para os níveis plasmáticos de P4 e IGF-1 e escore corporal. Não houve interação das variáveis classificatórias genótipo e tempo sobre os níveis das variáveis resposta em questão.

Tabela 12 - Efeito do genótipo e do tempo sobre os níveis plasmáticos de P4 (ng/mL) e IGF-1 (ng/mL) e perda de escore corporal (EC)

Variáveis Resposta	Genótipo			p	Tempo		p
	+ / +	+ / -	- / -		1	2	
P4 (ng/mL)	1,06 ± 0,2	1,1 ± 0,3	2,22 ± 0,5	0,2	1,86 ± 0,4 ^a	0,94 ± 0,2 ^b	0,01
IGF-1 (ng/mL)	58, 4 ± 7	58,1 ± 14	52,9 ± 12	0,98	84 ± 10 ^a	43 ± 6,7 ^b	0,001
Perda de EC	0,36 ± 0,05	0,32 ± 0,06	0,35 ± 0,07	0,92	0,3 ± 0,05	0,37 ± 0,05	0,46

Letras diferentes indicam que houve diferença estatística para $p < 0,05$

Não foi possível demonstrar efeito de genótipo para Dde-1 sobre os níveis plasmáticos de IGF-1 e P4, mas foi possível demonstrar efeito de tempo para P4 e IGF-1, como discutido anteriormente. Não foi possível demonstrar efeito de genótipo e de tempo sobre a perda de escore corporal.

6.7 RESULTADOS DAS CORRELAÇÕES (CORRELAÇÃO DE PEARSON)

A tabela 13 apresenta as possíveis correlações encontradas para este experimento:

Tabela 13- Resultado das correlações entre dias em aberto (DEA) , Produção de leite (kg) na lactação, Pico de produção (kg), Escore corporal, Níveis plasmáticos de IGF-1 e P4

	DEA (dias)	LACTAÇÃO (Kg)	PICO (Kg)	ESCORE CORPORAL	IGF-1 (ng/mL)	P4 (ng/mL)
IGF-1 (ng/mL)	-0,267 0,016	-0,424 ($< 0,0001$)	-0,231 ($< 0,0001$)	0,037 (0,74)	1,00	0,280 (0,011)
DEA (dias)	1,00	0,101 (0,37)	0,091 (0,41)	0,035 (0,78)	-0,267 (0,016)	-0,182 (0,104)
LACTAÇÃO (kg)	0,101 (0,37)	1,00	0,70 * ($< 0,0001$)	-0,125 (0,26)	-0,424 ($< 0,0001$)	-0,082 (0,46)
PICO (kg)	0,091 (0,41)	0,70 ($< 0,0001$)	1,00	-0,112 (0,31)	-0,231 (0,038)	-0,002 (0,97)
ESCORE CORPORAL	0,030 (0,78)	-0,112 (0,26)	-0,112 (0,31)	1,00	0,037 (0,74)	0,216** (0,053)
P4 (ng/mL)	-0,182 (0,10)	-0,0821 (0,46)	-0,002 (0,97)	(0,216) (0,053)	0,280 (0,011)	1,00

* houve correlação entre as variáveis

** houve tendência de correlação entre as variáveis.

a) Correlações entre IGF-1 e parâmetros reprodutivos:

De acordo com a tabela 13, observa-se que houve correlação negativa entre DEAs e níveis plasmáticos de IGF-1. Este resultado corrobora com aqueles encontrados na literatura, que frisam que quanto menor o nível de IGF-1, mais prolongado é o período de anestro apresentado pelas vacas. De acordo com a Tabela 13, foi possível demonstrar correlação positiva entre níveis de IGF-1 e P4, concordando com trabalhos citados na literatura, (TATCHER, 2001; BUTLER, 2000; YUNG et al, 1996; LUCY et al., (1992); BREIER, GLUCKMAN, 1991; SPICER et al., 1990).

Há uma série de experimentos comprovando que vacas que apresentam menores intervalos entre parto/ovulação também apresentavam maiores concentrações de IGF-1 plasmático nas primeiras semanas do pós-parto que animais em anestro prolongado. Estudos “in vitro” demonstraram que o aumento dos níveis de IGF-1 contribui para o aumento de sítios de ligação do LH, causando estímulo às células tecais para a produção de progesterona. Estes estudos sugerem que o IGF-1 desempenha importante papel sobre a resposta das células foliculares ao LH e, portanto, ao aumento da produção de estrógeno, pré-requisito para a ovulação e fator altamente relacionado à diminuição dos DEAs.

b) Correlação entre IGF-1 e parâmetros produtivos:

De acordo com a tabela 13, os níveis de IGF-1 apresentaram correlação negativa com parâmetros produtivos estudados (produção de leite na lactação e ao pico de lactação -kg). Este fato poderia ser explicado pelo fato de animais de alto mérito genético para produção ser metabolicamente selecionados para maiores níveis de GH e menores níveis de IGF-1. O GH é um hormônio relacionado a efeitos catabólicos, de mobilização de reservas corporais, principalmente em fase de déficit energético. O IGF-1, como já visto anteriormente, possui efeito anti catabólico e de modulação do metabolismo, quando de situações em que há baixa disponibilidade de energia, mas alta demanda energética para produção de leite, por exemplo, situação muito comum em vacas de alto mérito genético para produção, em início de lactação. (MONGET, BONDY, 2000; MONNIAUX et al., 1997; BREIER, GLUCKMAN, 1991)

c) Correlação entre níveis de P4 e escore corporal:

A tabela 13 mostra que houve forte tendência de correlação positiva entre P4 e escore corporal, talvez um número de observações maior pudessem demonstrar esta correlação. Este resultado concorda com a revisão de literatura realizada por Diskin et al. (2003), pois quanto maior for a condição corporal ao parto (3,0 – 3,5) e menor mobilização de gordura corporal para atender as demandas energéticas, menor será os níveis plasmáticos de NEFAs e mais rápido ocorre a retomada do ciclo do eixo hipotálamo/hipófise/ovariano no pós parto, contribuindo para aumentar os níveis de IGF-1 e P4 circulantes e no fluído intra folicular.

Neste trabalho, devido a perda de condição corporal apresentada pelos animais ter sido pequena, não foi possível observar a correlação sugerida por Hamudikuwanda et al., (1996). Neste trabalho, os autores observaram que quanto maior a perda de escore corporal (perdas acima de 0,5 unidades) nas primeiras quatro semanas do pós parto, maior seria a mobilização de gordura, aumentando os níveis de NEFAs, bem como de P4 que, segundo os mesmos, por ser um hormônio esteróide, seria armazenado no tecido adiposo ao longo da gestação. Para os autores, um severo BEN poderia levar a grande mobilização de gordura e, pelo exposto, acarretar altos níveis de P4 que, por sua vez, poderiam retardar o retorno a atividade reprodutiva.

7 CONCLUSÕES

Os sítios de restrição da enzima Alu-1 podem ser utilizados como marcadores genéticos para predição dos potenciais produtivos e reprodutivos na raça Holandesa.

Os sítios de restrição da enzima Dde-1, apesar de ter apresentado variabilidade genética, parecem não ser bons marcadores para predição dos potenciais produtivos e reprodutivos para a raça Holandesa.

Os níveis plasmáticos de IGF-1 são bons marcadores para correlacionar produção de leite na lactação (kg) produção de leite ao pico (kg), e DEAS (duração do anestro devido sua correlação com P4) de vacas leiteiras no início da lactação.

6.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mesmo não havendo variação genética para o polimorfismo do fragmento de restrição identificado pela enzima Alu-1, pois não foi identificado no experimento, nenhum animal com genótipo Val/Val, as diferenças obtidas para os genótipos Leu/Leu e Leu/Val, para perda de escore, níveis de produção e níveis de IGF-1, foi bastante consistente com a literatura apresentada, mesmo não tendo sido estatisticamente significativa, demonstrando que este fragmento parece ser um bom marcador genético para medir potencial produtivo e reprodutivo de rebanhos selecionados para produção leiteira.

Já o polimorfismo do fragmento de restrição identificado pela enzima Dde-1, embora apresente variação genética, parece ser um polimorfismo que poderia se melhor aplicado em animais dupla aptidão, como raça Simental e, poderia talvez predizer dados produtivos com maior consistência para raça Jersey, não sendo um bom marcador para raças Holandesas, devido, talvez, a alta pressão de seleção para maior mérito genético de produção de leite sofrido por esta raça ao longo dos anos.

Trabalhos envolvendo os dois sítios de restrição estudados neste experimento poderiam ser realizados para rebanhos de dupla aptidão, no sentido de caracterizar estes marcadores moleculares como auxiliares à seleção de leite ou corte nas raças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, J.; MOLITCH, M. E.; VAN WYK, J. J.; UNDERWOOD, L. E. Human growth hormone & somatomedin C suppress the spontaneous release of growth hormone in unanesthetized rats. **Endocrinology**, v.133, p.1319-1325, 1983.

BALSALOBRE, M. A. A; CORSI, M., SANTOS, P. M. Reinício da atividade luteal ovariana pós-parto de vacas sob pastejo em capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum). In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 33, 1996, Fortaleza. **Anais**: SBZ, 1996. p. 370-371.

BARUSELLI, P. S.; BARNABE, V. H.; VISINTIN, J. A.; MORELO-FILHO, J. R.; PORTO, R. Effect of body conditions score at calving on postpartum reproductive performance in buffalo. *Buffalo Journal*, v.1, p. 53-65, 2001.

BAUMRUCKER, C. R.; HADSELL, D. L.; BLUM, J. W. Effects of dietary insulin-like growth factor-1 on growth and insulin-like growth factor receptors in neonatal calf intestine. **Journal of Animal Science**, v.72, p. 428-432, 1994.

BISHOP, M. D.; TAVAKKOL, A.; THREADGILL, D. W.; SIMMER, F. A.; SIMMER, R. C. M.; DAVIS, M. E.; WOMACK, J. E. Somatic cell mapping and restriction fragment length polymorphism analysis of bovine insulin-like growth factor I. *Journal of Animal Science*, v.69, p. 4306-4312, 1991.

BREIER, B. H.; GLUCKMAN, P. D. The regulation of postnatal growth: nutritional influences on endocrine pathways and function of the somatotrophic axis. **Livestock Production Science**, v.27, p.77-94, 1991.

BREIER, B. H.; GLUCKMAN, P. D.; BASS, J. J. Influence of nutritional status and oestradiol-17 β on plasma growth hormone, insulin like growth factor I and II and the response to exogenous growth hormone in young steers. **Journal of Endocrinology**, v.118, p. 243-62, 1987.

BREIER, B. H. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis. **Domestic Animal Endocrinology**, v.17, p. 209-218, 1999.

BURTON, J. L.; MCBRIDE, B. W.; BLOCK, E.; GLIMM, D. R.; KENNELLY, J. J. A review of bovine growth hormone. **Canadian Journal of Animal Science**, v.74, p.167-176, 1994.

BUTLER, W. R.; SMITH, R. D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.72, p. 767-783, 1989.

BUTLER, W. R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 449-457, 2000.

CHALUPA, W.; GALLIGAN, D. T.; FERGUNSON, J. D. Animal nutrition and management in the 21 st century: dairy cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.58, p.1-18; 1996.

CHOMKZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of DNA, RNA and protein from cells tissue samples. **Biotechniques**, v.15, p. 532-537, 1993.

CROTHERS, D. M.; HARAN, T. E.; NADEAU, J. G. Intrinsically bent DNA, **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 70-93, 1990.

DAVIS, S. L.; GRAF, M.; MORRISON, C. A.; HALL, T. R.; SWIFT, P.S. Identification and partial purification of serum growth hormone binding protein in domestic animal species. **Journal of Animal Science**, v.70, p.773-785, 1992.

DISKIN, M. G.; MACKEY, D. R.; ROCHE, J. F.; SREENAN, J. M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science** v.78, p. 345-370, 2003.

DOMINGUEZ, M.M. Effects of body condition, status reproductive and breed on follicular population and oocyte quality in cows. **Theriogenology**, v.43, p.1405-1409, 1995.

ELSASSER, T. H.; RUMSEY, T. S.; HAMMOND, A. C. Influence of diet on basal and growth hormone-stimulated plasma concentrations of IGF-I in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.67, p.128-141, 1989.

EPPARD, P. J.; BENTLE, L. A.; VIOLAND, B. N.; GANGULI, S.; HINTZ, R. L.; KUNG, L.; KRIVI, G. G.; LANZA, G. M. Comparison of galactopoietic response to pituitary-derived variants of bovine growth hormone. **Journal of Endocrinology**, v.132, p. 47-56, 1992.

FARAH, S. B. DNA: segredos e mistérios. Local: São Paulo, 1997, 276 p.

FERGUSON, J. D. Diet, production and reproduction in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.59, p. 173-184, 1996.

GLUCKMAN, P. D.; BREIER, B. H. Symposium: growth hormone and biotechnology. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 442-466, 1987.

GONG, J. G. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p. 229-241, 2002.

GORDON, D. F.; QUICK, D. P.; ERWIN, C. R.; DONELSON, J. E.; MAURER, R. A. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.33, n. 1, p. 81-95, 1983.

GROCHOWSKA, R.; SORENSSEN, P.; ZWIERZCHOWSKI, L.; SNOCHOWSKI, M.; LOVENDAHL, P. Genetic variation in stimulated GH release and in IGF-1 of Young dairy

cattle and their associations with leucina/valina polymorphism in GH gene. **Journal of Animal Science**, v.79, p. 450-476, 2001.

HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in farm animals**. 6. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 573 p.

HAMUDIKUWANDA, H.; GALLO, G.; BLOCK, E.; DOWNEY, B. R. Adipose tissue progesterone concentration in dairy cows during late pregnancy and early lactation. **Animal Reproduction Science**, v.43, p.15-23, 1996.

HART, I.C.; BLAKE, L.A.; CHADWICK, P.M.A.; PAYNE, G.A.; SIMMONDS, A.D. The heterogeneity of bovine growth hormone extraction from the pituitary of components with different biological and immunological properties. **Biochemical Journal**, v.218, p.773-783, 1985.

HOJ, S.; FREDHOLM, M.; LARSEN, N. J.; NIELSEN, V. H. Growth hormone polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. **Animal Genetics**, v.24, p. 91-96 1993.

JORDÃO, L. P. Quanto custa um longo intervalo entre partos? **Revista Gado Holandês**, v.2 p. 36-38, 1993.

KASTELIC, J. P. Gonadal development and function in cattle. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 3, p. 1-5, 1997.

KIRKPATRICK, B. W.; HUFF, B. M.; CASAS-CARRILO, E. Double-strand DNA conformation polymorphism as source of highly polymorphic genetic markers. **Animal Genetics**, v. 24, p. 155-165, 1993.

LACKEY, B. R.; GRAY, S. L. L.; HENRICKS, D. M. Physiological basis for use of insulin-like growth factors in reproductive applications: A Review. **Theriogenology**, v. 53, p. 1147-1156, 2000.

LAWRENCE, T.L.J.; FOWLER, V.R. **Growth of farm animals**. Wallingford: Cab International, p. 382, 1999.

LUCY, M. C.; BECK, J.; STAPLES, C. R.; HEAD, H. H; SOTA, R. L.; TATCHEN, W. W. Follicular dynamics, plasma metabolites, hormones and insulin like growth factor I (IGF-I) in lactating cows with positive or negative balance during the pre-ovulatory period. **Reproduction Nutrition**, v. 32, n. 4, p. 331-341, 1992.

LUCY, M. C.; HAUSER, S. D.; EPPARD, S. D.; KRIVI, P. J.; CLARK, G. G.; BAUMANN, D. E.; COLLIER, R. J. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 10, n. 4, p. 325-333, 1993.

LUCY, M. C.; STAPLES, C. R.; MICHEL, F. M.; THATCHER, W. W. Energy balance and size of and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 473-482, 1991.

MARANHÃO, A. M. **Polimorfismo no gene do GH como possível marcador molecular em bovinos**. 1999. 38 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

MONGET, P.; BONDY, C. Importance of the IGF-1 in early folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, p. 89-93, 2000.

MONNIAUX, D.; MONGET, P.; BESNARD, N.; HUET, C.; PISSELET, C. Growth factor and antral follicular development in domestic ruminants. **Theriogenology**, v. 47, p. 3-12, 1997.

PEEL, J. M.; BATES, P. C. The nutritional regulation of growth hormone action. **Nutrition Research Reviews**, v. 3, p. 163-192, 1990.

ROCHE, J. F.; MACKEY, D.; DISKIN, M. D. Reproductive management of postpartum cows. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 703-712, 2000.

ROSS, R. J. M.; BUCHANAN, C. R. Growth hormone secretion: its regulation and the influence of nutritional factors. **Nutrition Research Reviews**, v. 3, p. 146-162, 1990.

RUSSEL Body Condition Score. **In Practice**, v. 9, p. 284-289, 1984.

SCHLEE, P.; GRAMI, R.; SCHALLENBERGER, E.; SCHAMS, D.; ROTTMANN, R.; OLBRICH-BLUDAU, A.; PIRCHNER, F. Growth hormone and insulin-like growth factor 1 concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. **Theoretical Applied Genetics**, v. 88, p. 497-500, 1994.

SKAAR, T.C.; BAUMRUCKER, C.R.; DEEVER, D.R.; BLUM, J.W. Diet effects and ontogeny of alterations of circulating insulin-like growth factor binding proteins in newborn dairy calves. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 421-437, 1994.

SNIJDERS, S. E. M.; DILLON, P. G.; O'FARRELL, K. J.; DISKIN, M.; WYLIE, A. R. G.; O'CALLAGHAN, D. O.; RATH, M.; BOLAND, M. P. Genetic merit for milk production and reproductive success in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 65, p. 17-31, 2001.

SNYDERS, S. E. M.; DILLON, P.; CALLAGHAN, D. O.; BOLAND, M. P. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. **Theriogenology**, v. 53, p. 981-989, 2000.

SORENSEN, P.; GROCHOWSKA, L.; HOLM, M.; HENRYON, M.; LOVENDAHL, P. Polymorphism in the bovine growth hormone gene affects endocrine release in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1887-1893, 2002.

SPICER, L. J.; TUCKER, W. B.; CEDAMS, G. D. Insulin like growth factor I in dairy cow: relationships among energy balance body condition, ovarian activity and estrus behavior. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 929-937, 1990.

STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W.; GARCIA-BOJALIL, C. M.; LUCY, M. C. Nutritional influences on reproductive function. In: _____ **Large dairy herd management**. Local: Van Horn and Wilcox, 1992. p. 383-391.

STUDER, E. Veterinary perspective of on-farm evaluation of nutrition and reproduction. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 872-876, 1998.

TAYLOR, J. F.; COUTINHO, L. L.; HERRING, K. L.; GALLAGHER, D. S.; BRENNMAN, R. A.; BURNEY, N.; SANDERS, J. O.; TURNER, J. W.; SMITH, S. B.; MILLER, R. K.; SAVELL, J. W.; DAVIS, S. K. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. **Animal Genetics**, v. 29, p. 194-201, 1998.

THATCHER, W. W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J.; STAPLES, C. R.; RISCO, C. A. Factors influencing reproductiva efficiency. In: The 5th Western Dairy Management Conference, april 4-6, Las Vegas, Nevada, **Proceedings**, p. 107-115, 2001.

WEAVER, L.D. Reproductive managment prograns for large dairies . In: _____ **Current Therapy in Theriogenology**, W. B. Saunders Company, p.382, 1986.

WEBB, R.; ARMSTRONG, D. G. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on folliculart turnover in cattle: a review. **Livestock in Production Science**, v. 53, p. 95-112, 1998.

WHITLEY, N. C.; BARB, C. R.; UTLEY, R. V.; POPWEL, J. M.; KRAETING, R. R.; RAMPACECK, G. B. Influence of estage of the estrous on insulin-like growth factor-I modulation of luteinizing hormone in the gilt. **Biology of Reproduction**, v. 53, n.6, p. 1359-1364, 1995.

WILDMAN, E. ; JONES, G. M.; WAGNER, P.E.; BOWMAN, R.L. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 495-501, 1982.

YAO, J.; AGGREY, S. E.; ZADWORN, D.; HAYES, J. F.; KUHNLEIN, U. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphins (SSCP) analysis and their association with milk production traits in holsteins. **Genetics**, v. 144, p. 1809-1816, 1996.

YUNG, M. C.; VANDERHAAR, M. J.; FOGWELL, R. L.; SHARMA, B. K. Effect of energy balance and somatotropin on insulin-like growth factor I in serum and weight and progesterone of corpus luteum in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2239-2244, 1996.

ZUREK, E.; FOXCROFT, G.R.; KNNELLY, J.J. Metabolic status and interval to first ovulation in postpartun dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 9, p. 1909-1920, 1995.

ZWIERZCHOWSKI, L.; KRZYZEWSKI, J.; STRZALKOWSKA, N.; SIADKOWSKA, E.; RYNIEWICZ, Z. Effects of polymorphism of growth hormone (GH), Pit-1, and leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black and White cows. **Animal Science Papers and Reports**, v. 20, n. 4, p. 213-227, 2002.