RODOLFO DANIEL MINGOTI

**Qualidade oocitária e embrionária e perfil hormonal e metabólico de
vacas repetidoras de serviço submetidas à secagem e indução de lactação**

São Paulo

2018

RODOLFO DANIEL MINGOTI

Qualidade oocitária e embrionária e perfil hormonal e metabólico de vacas repetidoras de serviço submetidas à secagem e indução de lactação

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo

2018

ERRATA

MINGOTI, R. D. **Qualidade oocitária e embrionária e perfil hormonal e metabólico de vacas repetidoras de serviço submetidas à secagem e indução de lactação.** 2018. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Página

Onde se lê

Leia-se

p. 8

À FAPESP pelo apoio financeiro durante a fase do doutorado (Bolsa de estudos 2014/19460-4 e auxílio pesquisa 2015/19563-0).

Pelo apoio financeiro durante a fase do doutorado – bolsa de estudos e auxílio à pesquisa, respectivamente processos nº 2014/19460-4 e 2015/19563-0, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida no âmbito do Convênio FAPESP/CAPES (processo n. 2014/19460-4).

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3695
FMVZ

Mingoti, Rodolfo Daniel
Qualidade oocitária e embrionária e perfil hormonal e metabólico de vacas repetidoras de serviço submetidas à secagem e indução de lactação / Rodolfo Daniel Mingoti. – 2018.
131 p. : il.

Doutorado (Tese) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Vacas leiteiras. 2. Teste de tolerância à glicose. 3. *Ovum pick-up*. 4. Resistência insulínica. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Qualidade oocitária e embrionária, perfil hormonal e metabólico de vacas Repetidoras de Serviço submetidas à secagem e indução de lactação", protocolada sob o CEUA nº 8510170714 (ID 001789), sob a responsabilidade de **Pietro Sampaio Baruselli e equipe; Rodolfo Daniel Mingoti; Rômulo Germano de Rezende; Lais Mendes Vieira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/11/2015.

We certify that the proposal "Oocyte and embryo quality, hormonal and metabolic profile of repeaters breeders cows submitted to drying and induction of lactation", utilizing 50 Bovines (50 females), protocol number CEUA 8510170714 (ID 001789), under the responsibility of **Pietro Sampaio Baruselli and team; Rodolfo Daniel Mingoti; Rômulo Germano de Rezende; Lais Mendes Vieira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/17/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **Out/201** a **Mai/201**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **a**

N: **50**

Linhagem: **Holandês**

Peso: **a**

Local do experimento:

São Paulo, 05 de agosto de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MINGOTI, Rodolfo Daniel

Título: Qualidade oocitária e embrionária e perfil hormonal e metabólico de vacas repetidoras de serviço submetidas à secagem e indução de lactação

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Agradeço

A Deus, pela minha família, dons e as graças recebidas.

Aos meus pais, Vera (Dona Zica) e Donizetti (Zico), pelo constante incentivo e incansável sacrifício para proporcionar aos seus filhos a oportunidade de realizarem os sonhos mais grandiosos.

Aos meus irmãos Renata e Rafael pela enorme amizade e amor em todos os momentos.

Aos meus amados sobrinhos: Fernando e Pedro e a mais nova princesinha, Maria Clara!!

À minha namorada Tamie por me aguentar, consolar e apoiar cada passo com carinho. Obrigado popotinha, amo você! E não poderia esquecer da Luna que é a alegria da nossa casa e de nossas vidas...

À minha segunda família: Kaki (Gustavo), Kazão (Rodrigo), Jeferson e Ivan

Vocês são a minha vida!

*Ao Prof. **Pietro Baruselli**, pelo exemplo de profissionalismo, humildade, trabalho e dedicação. Obrigado pela orientação, pela confiança investida e pela oportunidade de aprender.*

*À querida **Harumi**, por toda ajuda que me deu nesse tempo de VRA. Sem dúvidas, devo a você um pedacinho dessa tese. Muito obrigado!*

*Aos queridos amigos, **Pietrinhos**: Romulo (doidão), Bernardo, Marcão, Guilherme (Gaúcho), Flávia, Mariana, Laísa (Doidinha), Walter (Tubarão), Bruna, Laís, Lisbek e Damiana; e aos **Pietrossaruraus**: Alex, Zé Nélio, Manoel, Gustavão, Brunão, Laís, Milí, Júlia, Karboxy e Bruna. Desde o primeiro dia cada um de vocês me recebeu com carinho. Obrigado pelo constante aprendizado, por todas as conversas, conselhos. É uma honra para mim poder ter trabalhado com vocês e tê-los como amigos. Muito obrigado!*

*Aos amigos do departamento, **Camila**, Prof a. **Cláudia**, Prof a. **Camila**, Prof a. **Mayra**, Prof. **Rubens**, Prof a. **Carla**, Prof. **Visintín**, Prof. **Ricardo**, Prof. **André**, Prof a. **Annelise**, Prof. **Ed**, muito obrigado pelos conhecimentos transmitidos durante as disciplinas, pelo apoio e pela convivência durante esse período.*

*Aos grandes amigos **Aníbal** e **Enílson** que durante anos confiaram os animais do IZ e não mediram esforços em ajudar-nos.*

*Aos amigos **Ana**, **Donizetti** e **João** (funcionários do IZ – Fazenda Palmeiras) e ao pesquisador **Gustavo** e funcionários **Adílson**, **Celso**, **Dé***

e Zé Maria da Experimental de Zootecnia do IZ em Andradina pela grande amizade e participação em todas as etapas deste projeto.

À USP por fornecer subsídios essenciais para minha formação acadêmica.

Ao Instituto de Zootecnia - APTA (Fazenda Palmeiras - Nova Odessa - SP) e Estação Experimental de Zootecnia do IZ em Andradina por disponibilizarem todos animais, recursos infraestrutura para a realização deste projeto.

À FAPESP pelo apoio financeiro durante a fase do doutorado (Bolsa de estudos 2014/19460-4 e auxílio pesquisa 2015/19563-0).

E por fim, agradeço às amadas vacas leiteiras, por serem minhas queridas companheiras. Obrigada pela participação de cada uma neste estudo (em especial a Antina) e em tantos outros que já acompanhei. Sem vocês nada disso aconteceria! Muito obrigado leiteiras!

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará vivendo o impossível.”

São Francisco de Assís

RESUMO

MINGOTI, R. D. **Qualidade oocitária e embrionária e perfil hormonal e metabólico de vacas repetidoras de serviço submetidas à secagem e indução de lactação** [Oocyte and embryo quality, hormonal and metabolic profile in repeat breeder cows submitted to drying and induction of lactation]. 2018. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A hipótese do presente estudo sugere que a baixa fertilidade de vacas Holandesas (*Bos taurus*) repetidoras de serviço (RS) está relacionada à baixa qualidade oocitária que, por sua vez, é associada ao quadro de resistência periférica à insulina (RPI). Ainda, a indução de lactação (IL) em vacas Holandesas (*Bos taurus*) RS pode reverter o quadro de RPI e, consequentemente, melhorar a qualidade oocitária e a produção *in vitro* de embriões (*PIVE*). Para testar a hipótese proposta, este estudo objetivou avaliar o efeito da fase da lactação e da gestação [Exp. 1], o efeito da secagem de RS [Exp. 2] e o efeito da IL [Exp. 3] sobre a RPI, a qualidade oocitária e a *PIVE* em vacas da raça Holandesa (*Bos taurus*). Nos três estudos foram realizados testes de tolerância à glicose (TTG) para avaliar a RPI através do perfil hormonal sérico de insulina e glicose. Além disso, avaliou-se o perfil bioquímico sérico e folicular e a qualidade oocitária através da *PIVE*. Verificou-se que, em resposta à infusão de 0,3mg glicose/kg PV, as vacas RS no final da lactação secretaram 53% mais insulina e captaram 40% menos de glicose quando comparadas as vacas no terço inicial de lactação (Exp 1). Esses achados são indicativos do estabelecimento do quadro de RPI nas vacas RS em lactação. Durante o período seco, as vacas RS secretaram 96% mais insulina e captaram 56% menos glicose que as vacas no terço inicial da lactação e as vacas RS em lactação, respectivamente (Exp. 2). Ainda, as vacas com lactação induzida secretaram 11% menos insulina e captaram a mesma quantidade de glicose que vacas paridas em fases semelhantes de lactação (Exp 3), demonstrando que o protocolo de IL foi eficiente em alterar o perfil metabólico, revertendo o quadro de RPI presente nas vacas RS. Nos Exp. 1, 2 e 3 foram verificadas maiores concentrações plasmática de triglicérides (TG; $P < 0,05$), colesterol total (COL; $P < 0,05$) e LDL ($P < 0,05$) no soro sanguíneo em vacas RS quando comparadas com vacas no terço inicial de lactação. Durante o período seco (Exp. 2 e 3), observou-se incremento desses metabólitos, destacando aumento na concentração de TG ($P < 0,05$), COL ($P < 0,05$) e LDL ($P < 0,05$) plasmático em vacas secas quando comparadas as vacas em lactação [início e final (RS) da lactação]. No líquido folicular foram observadas variações no perfil bioquímico para COL e TG. Nos Exp. 1, 2 e 3, verificou-se que vacas RS possuem maior concentração de TG ($P < 0,05$) e COL ($P < 0,05$) no fluido folicular do que vacas no

terço inicial de lactação. Contrariando a hipótese inicialmente proposta, as vacas RS em lactação e as vacas secas apresentaram maior taxa de blastocisto ($P < 0,05$) e número de blastocistos por OPU ($P < 0,05$) que as vacas no terço inicial de lactação (Exp. 1, 2 e 3). Através do perfil de insulina circulante em resposta ao TTG foi possível demonstrar o estabelecimento do quadro de RPI em vacas RS ($P < 0,05$). Além disso, constatou-se agravamento da RPI em vacas secas ($P < 0,05$). Esse quadro foi associado ao aumento do escore de condição corporal ($P < 0,05$) e do peso vivo (kg; $P < 0,05$) nas vacas RS. Em conclusão, não foi verificada associação negativa entre RPI, qualidade oocitária e *PIVE* em vacas Holandesas (*Bos taurus*) RS. Apesar da indução de lactação em vacas Holandesas (*Bos taurus*) RS alterar o metabolismo e diminuir o quadro de RPI, não foi verificado efetivo positivo na qualidade oocitária e na *PIVE*.

Palavras-chave: Vacas leiteiras. Teste de tolerância à glicose. *Ovum pick-up*. Resistência insulínica.

ABSTRACT

MINGOTI, R. D. **Oocyte and embryo quality, hormonal and metabolic profile in repeat breeder cows submitted to drying and induction of lactation.** [Qualidade oocitária e embrionária e perfil hormonal e metabólico de vacas repetidoras de serviço submetidas à secagem e indução de lactação]. 2018. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The hypothesis of the present study suggests that low fertility of repeat breeders (RB) Holstein (*Bos taurus*) cows is related to low oocyte quality, which is associated with peripheral insulin resistance (PIR). Also, induction of lactation (IL) in RB Holstein (*Bos taurus*) cows can revert PIR and, consequently, improve oocyte quality and *in vitro* embryo production (IVEP). In order to test the proposed hypothesis, the objective of this study was to evaluate the effect of phase of lactation and gestation [Exp. 1], effect of drying RB [Exp. 2] and effect of IL [Exp. 3] on PIR, oocyte quality and IVEP of Holstein (*Bos taurus*) cows. In all three studies, glucose tolerance tests (GTT) were performed to evaluate PIR through the serum hormonal insulin and glucose profile. In addition, we evaluated the serum and follicular biochemical profile and oocyte quality through IVEP. It was verified that, in response to a 0.3mg glucose/kg of body weight (BW), RB cows at the end of lactation secreted 53% more insulin and captured 40% less glucose when compared to cows in the initial third of their lactation (Exp. 1). These findings are indicative of the establishment of PIR in RB lactating cows. During the dry period, RB cows secreted 96% more insulin and captured 56% less glucose than cows in the initial third of their lactation and RB lactating cows, respectively (Exp. 2). Also, cows with induced lactation secreted 11% less insulin and captured the same amount of glucose than calved cows in similar lactation phase (Exp. 3), demonstrating that the IL protocol was efficient to alter the metabolic profile, reverting PIR present in RB cows. In Exp. 1, 2 and 3 higher plasmatic concentrations of triglycerides (TG; $P < 0.05$), total cholesterol (COL; $P < 0.05$) and LDL ($P < 0.05$) were verified in the blood serum in RB cows when compared to cows in the initial third of their lactation. During the dry period (Exp. 2 and 3), we observed the increment of these metabolites, and a notable elevation of the plasmatic TG ($P < 0.05$), COL ($P < 0.05$) and LDL ($P < 0.05$) in dry cows when compared to lactating cows [beginning and end (RB) of lactation]. In the follicular fluid, it was possible to observe variations in the biochemical profile for COL and TG. In Exp. 1, 2 and 3, it was verified that RB cows have higher concentration of TG ($P < 0.05$) and COL ($P < 0.05$) in the follicular fluid than cows in the initial third of their lactation. Contrary to the initially proposed hypothesis, RB lactating cows and dry cows presented higher

blastocyst rate ($P<0.05$) than cows in the initial third of lactation (Exp. 1, 2 and 3). Through the circulating insulin profile in response to the GTT it was possible to demonstrate the establishment of PIR in RB cows ($P<0.05$). Also, it was observed worsening of the PIR in dry cows ($P<0.05$). This condition was associated with an increase in body condition score ($P<0.05$) and BW (kg; $P<0.05$) in RB cows. In conclusion, no negative association between PIR, oocyte quality and IVEP was observed in RB Holstein (*Bos taurus*) cows. Although induction of lactation in RB Holstein (*Bos taurus*) cows altered the metabolism and reduced PIR, no positive effect was observed in oocyte quality and IVEP.

Keywords: Dairy cows. Glucose tolerance test. Ovum pick-up. Insulin resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O modelo hipotético demonstra as alterações no perfil metabólico-hormonal durante a lactação e período seco em vacas leiteiras.	25
Figura 2 - Delineamento experimental para aspiração folicular da <i>PIVE</i> , coleta de líquido folicular e TTG em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>); <i>PIVE</i> = produção <i>in vitro</i> de embriões; FF – Coleta de líquido folicular; TTG – Teste de tolerância a glicose.	46
Figura 3 - Desenho Experimental – Resistência periférica a insulina em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação e vacas no terço final da lactação (repetidora de serviço e vacas prenhez).	46
Figura 4 – (A e B) Tubos de Centrifugação Tipo Falcon de 50 ml com amostras de líquido folicular após coleta por aspirações folicular guiada por ultrassonografia (OPU).	54
Figura 5- (A e B) Amostras de sangue para análise metabólica e hormonal.	54
Figura 7 - Perfil de glicose circulante (Média ± EPM) em resposta ao teste de tolerância à glicose intravenosa (GTT; 0,3 g / kg de PV de glicose <i>i.v.</i>) de vacas Holandesas no terço inicial da lactação (n=9; DEL < 50 dias) e no terço final da lactação [DEL > 300 dias - repetidora de serviço (n=10) ou prenhez (n=9)].	61
Figura 8 – Perfil de insulina circulante (Média ± EPM) em resposta ao teste de tolerância à glicose intravenosa (GTT; 0,3 g / kg de PV de glicose <i>i.v.</i>) de vacas Holandesas no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação [DEL > 300 dias - repetidora de serviço (n=10) ou prenhez (n=9)].	62
Figura 9 Delineamento experimental para aspiração folicular da <i>PIVE</i> , coleta de líquido folicular e TTG em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>); <i>PIVE</i> = produção <i>in vitro</i> de embriões; FF – Coleta de líquido folicular; TTG – Teste de tolerância a glicose.	67
Figura 10 - Desenho Experimental – Resistência periférica a insulina em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação, no terço final da lactação (repetidora de serviço) e vacas repetidoras de serviço secas.	67
Figura 11 - Perfil de glicose circulante (Média ± EPM) em resposta ao teste de tolerância à glicose intravenosa (GTT; 0,3 g / kg de PV de glicose <i>i.v.</i>) em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial (n=9; DEL < 100 dias), no terço final da lactação (n=8; DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (n=9; período seco > 100 dias).	76
Figura 12 – Perfil de insulina circulante (Média ± EPM) em resposta ao teste de tolerância à glicose intravenosa (GTT; 0,3 g / kg de PV de glicose <i>i.v.</i>) em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial (n=9; DEL < 100 dias), no terço final da lactação (n=8; DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (n=9; período seco > 100 dias).	77
Figura 13 – Taxa de prenhez de embriões vitrificados de vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhe) após transferências de embriões em tempo fixo em receptoras Nelore (<i>Bos indicus</i>) [Andradina – SP / Janeiro, 2018]	79
Figura 14 - Desenho Experimental - Efeito da secagem resistência periférica a insulina e produção <i>in vitro</i> de embriões de vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação, no terço final da lactação, secas e após a indução de lactação; FF – Coleta de líquido folicular; TTG – Teste de tolerância a glicose.	82

Figura 15 - Esquema Experimental - Efeito da secagem resistência periférica a insulina e produção <i>in vitro</i> de embriões de vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação, no terço final da lactação, secas e após a indução de lactação.....	82
Figura 16 – Desenho esquemático do Protocolo de indução de lactação	84
Figura 17 – (A) Material utilizado para teste de tolerância a glicose; (B) Produtos utilizados para o procedimento de secagem de vacas em lactação.	85
Figura 18 – Instalações e animais durante o teste de tolerância a glicose.	85
Figura 19 – (A) Grupo de Vacas no terço inicial da lactação; (B) Grupo de vacas secas submetidas a indução de lactação; (C) grupo de vacas secas	86
Figura 20 – (A, B e C) Desenvolvimento da glândula mamária durante o protocolo hormonal de indução de lactação. (D) produção de leite após ordenha 45 dias após a indução de lactação.	87
Figura 21 – (A e B) Grupo de vacas submetidas ao protocolo hormonal de indução de lactação após o fornecimento de dieta completa em instalações do tipo “open lote”.	88
Figura 22 – Gráficos de interações tempo*categoria dos parâmetros bioquímicos séricos [Ureia, Triglicérides e NEFA] em um intervalo de 64 dias em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação [após parto fisiológico (n=9) ou após protocolo hormonal de indução de lactação (n=9), DEL < 120 dias], no terço final da lactação (n=8; DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (n=9; período seco > 300 dias) [Nova Odessa – SP / agosto a dezembro de 2016].	94
Figura 23 - Gráficos de interações tempo*categoria dos parâmetros bioquímicos séricos [NEFA, BHBA e LDL] em um intervalo de 64 dias em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação [após parto fisiológico (n=9) ou após protocolo hormonal de indução de lactação (n=9), DEL < 120 dias], no terço final da lactação (n=8; DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (n=9; período seco > 300 dias) [Nova Odessa – SP / agosto a dezembro de 2016].	95
Figura 24 - Perfil de glicose circulante (Média ± EPM) em resposta ao teste de tolerância à glicose intravenosa (GTT; 0,3 g / kg de PV de glicose i.v.) de vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação [após parto fisiológico (n=9) ou após protocolo hormonal de indução de lactação (n=9) DEL < 120 dias], no terço final da lactação (n=8; DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (n=9; período seco > 300 dias).	96
Figura 25 – Perfil de insulina circulante (Média ± EPM) em resposta ao teste de tolerância à glicose intravenosa (GTT; 0,3 g / kg de PV de glicose i.v.) de vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação [após parto fisiológico (n=9) ou após protocolo hormonal de indução de lactação (n=9); DEL < 120 dias], no terço final da lactação (n=8; DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (n=9; período seco > 300 dias).	97
Figura 26 - Taxa de prenhez de embriões vitrificados de vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação (após parto fisiológico ou após protocolo hormonal de indução de lactação, DEL < 120 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 300 dias) após transferências de embriões em tempo fixo em receptoras Nelore (<i>Bos indicus</i>) [Andradina – SP / Janeiro, 2018].	100
Figura 27 – Evolução do escore de condição corporal e peso vivo (kg) em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação [após parto fisiológico (n=9) ou após protocolo hormonal de indução de lactação (n=9); DEL < 120 dias], no terço final da lactação (n=8; DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (n=9; período seco > 300 dias) [Nova Odessa – SP / agosto a dezembro de 2016].	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características produtivas e reprodutivas em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) de vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016].	59
Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos séricos de vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016]	60
Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos avaliados no líquido folicular de vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016]	60
Tabela 4 – Concentração plasmática de glicose em resposta ao teste de tolerância à glicose (0,3 g / kg de PV de glicose <i>i.v.</i>) de vacas Holandesas no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL> 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016].	61
Tabela 5 – Concentração plasmática de insulina em resposta ao teste de tolerância à glicose (0,3 g / kg de PV de glicose <i>i.v.</i>) de vacas Holandesas no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL> 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016].	62
Tabela 6 – Secreção de insulina (A) e captação de glicose (B) em resposta ao teste de tolerância à glicose em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016]	63
Tabela 7 –Produção <i>in vitro</i> de embriões em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016]	64
Tabela 8 - Características produtivas e reprodutivas em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial (DEL < 100 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 100 dias) [março e julho de 2016].	74
Tabela 9 – Parâmetros bioquímicos séricos em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial (DEL < 100 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 100 dias) [março e julho de 2016].	75
Tabela 10 – Parâmetros bioquímicos avaliados no líquido folicular em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial (DEL < 100 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 100 dias) [março e julho de 2016].	75
Tabela 11 – Concentração plasmática de glicose em resposta ao teste de tolerância à glicose (0,3 g / kg de PV de glicose <i>i.v.</i>) em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial (DEL < 100 dias), no terço final da lactação (DEL>300 d - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco>100 dias) [março e julho de 2016].	76
Tabela 12 – Concentração plasmática de insulina em resposta ao teste de tolerância à glicose (0,3 g / kg de PV de glicose <i>i.v.</i>) em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial (DEL < 100 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 100 dias) [março e julho de 2016].	77
Tabela 13 – Secreção de insulina (A) e captação de glicose (B) em resposta ao TTG em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>)	78

Tabela 14 – Produção <i>in vitro</i> de embriões em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016]	79
Tabela 15 – Características produtivas e reprodutivas de vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação (após parto fisiológico ou após protocolo hormonal de indução de lactação, DEL < 120 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 300 dias) [Nova Odessa – SP / agosto a dezembro de 2016].....	91
Tabela 16 – Parâmetros bioquímicos séricos de vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação (após parto fisiológico ou após protocolo hormonal de indução de lactação, DEL < 120 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 300 dias).	94
Tabela 17 – Parâmetros bioquímicos avaliados no líquido folicular de vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação (após parto fisiológico ou após protocolo hormonal de indução de lactação, DEL < 120 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 300 dias). 95	
Tabela 18 – Concentração plasmática de glicose em resposta ao teste de TTG (0,3 g / kg de PV de glicose i.v.) de vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação (após parto fisiológico ou após protocolo hormonal IL, DEL < 120 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - RS) e vacas secas (período seco >300 dias).....	96
Tabela 19 – Concentração plasmática de insulina em resposta ao teste de tolerância à glicose (0,3 g / kg de PV de glicose i.v.) de vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação (após parto fisiológico ou após protocolo hormonal de indução de lactação, DEL < 120 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 300 dias) [Nova Odessa – SP / agosto a dezembro de 2016]	97
Tabela 20 – Produção <i>in vitro</i> de embriões de vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação (após parto fisiológico ou após protocolo hormonal de indução de lactação, DEL < 120 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 300 dias).	98
Tabela 21 – Secreção de insulina (A) e captação de glicose (B) em resposta ao teste de tolerância à glicose em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>) no terço inicial da lactação (após parto fisiológico ou após protocolo hormonal de indução de lactação, DEL < 120 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 300 dias) [Nova Odessa – SP / agosto a dezembro de 2016].....	99

LISTA DE SIGLAS

°C	graus Celsius
μmol	micromol
UI	unidade internacional
AGNE	ácidos graxos não esterificados
BEN	balanço energético negativo
BHB	beta-hidroxibutirato
CCO	complexos cúmulus-oócito
CL	corpo lúteo
ECC	escore de condição corporal
EPM	erro padrão da média
FD	folículo dominante
g	grama
GLUT	proteína transportadora de glicose
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
h	Horas
HPB	holandesa preta e branca
IGF	hormônio do crescimento semelhante à insulina
IGFR	receptor para hormônio do crescimento semelhante à insulina
<i>k</i>	taxa de metabolismo
Kg	kilograma
L	litro
LH	hormônio luteinizante
mg	miligrama
min	minuto
MIV	maturação <i>in vitro</i>
ml	mililitro
mm	milímetro
MS	matéria seca
n	número de unidades experimentais
ng	nanograma
OPU	aspiração folicular
P	probabilidade
<i>PIVE</i>	produção <i>in vitro</i> de embriões
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SFB	soro fetal bovino
<i>T</i> _{1/2}	meia vida
TE	transferência de embriões
TTG	teste de tolerância à glicose
Δ máx.	variação máxima

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO	21
2. MODELO HIPOTÉTICO.....	23
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	26
3.1 <i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>27</i>
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	28
4.1 <i>Síndrome metabólica, inflamação, estresse oxidativo e dislipidemia</i>	<i>28</i>
4.2 <i>Mecanismos de liberação de insulina.....</i>	<i>31</i>
4.3 <i>Resistência periférica a insulina em bovinos leiteiros</i>	<i>33</i>
4.4 <i>Associação da RPI com a fertilidade</i>	<i>36</i>
4.5 <i>Indução de lactação</i>	<i>38</i>
4.5.1 <i>Indução de lactação vs. fertilidade</i>	<i>41</i>
Experimento I	43
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
5.1 <i>Aspectos éticos no uso de animais</i>	<i>44</i>
5.2 <i>Local, período de execução e origem dos animais</i>	<i>44</i>
5.3 <i>Animais e Instalações</i>	<i>44</i>
5.4 <i>Grupos Experimentais, Randomização e Unidade Experimental</i>	<i>45</i>
5.5 <i>Delineamento Experimental</i>	<i>46</i>
5.6 <i>Desenho experimental.....</i>	<i>46</i>
5.7 <i>Procedimentos Experimentais</i>	<i>47</i>
5.7.1 <i>Aspirações folicular guiada por ultrassonografia (OPU)</i>	<i>47</i>
5.7.2 <i>Maturação in vitro</i>	<i>49</i>
5.7.3 <i>Fertilização in vitro</i>	<i>49</i>
5.7.4 <i>Cultivo in vitro</i>	<i>50</i>
5.8 <i>Coletas de sangue, líquido folicular, análise metabólica e hormonal.....</i>	<i>50</i>
5.9 <i>Análise metabólica e hormonal</i>	<i>51</i>
5.9.1 <i>Análise de insulina.....</i>	<i>51</i>
5.10 <i>Teste de Tolerância à glicose (TTG).....</i>	<i>52</i>
5.11 <i>Sensibilidade a insulina</i>	<i>52</i>
5.12 <i>Análise estatística</i>	<i>55</i>
6. RESULTADOS.....	57
Experimento II.....	65
7. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
7.2 <i>Local, período de execução e origem animais.....</i>	<i>66</i>

7.3	<i>Animais e Instalações</i>	66
7.4	<i>Grupos Experimentais, Randomização e Unidade Experimental</i>	66
7.5	<i>Delineamento experimental</i>	67
7.6	<i>Desenho Experimental</i>	67
7.7	<i>Procedimentos Experimentais</i>	68
7.9	<i>Análises estatísticas</i>	70
8.	RESULTADOS	72
	<i>Experimento III</i>	80
9.	MATERIAL E MÉTODOS	81
9.2	<i>Local, período de execução e origem dos animais</i>	81
9.3	<i>Grupos Experimentais, Randomização e Unidade Experimental</i>	81
9.4	<i>Delineamento experimental</i>	82
9.5	<i>Desenho experimental</i>	82
9.6	<i>Procedimentos Experimentais</i>	83
9.7	<i>Análises estatísticas</i>	89
10.	RESULTADOS	91
11.	DISCUSSÃO GERAL	101
12.	CONCLUSÃO	110
13.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS	111
	BIBLIOGRAFIA	112
	ANEXOS	129

1. INTRODUÇÃO

O acelerado crescimento populacional humano está gerando constantes preocupações referentes ao fornecimento de alimento em adequada proporção (FAO, 2002; GILLAND, 2002). Nesse contexto, a expansão do agronegócio se destaca como ponto chave na resolução desse impasse. Na pecuária, a maximização da produção de leite está intimamente ligada à eficiência reprodutiva dos rebanhos, e reforça a importância de pesquisas direcionadas para essa área. No entanto, apesar do avanço das técnicas de reprodução assistida, algumas variáveis de origem biológica e metabólica são barreiras importantes que comprometem o desempenho reprodutivo da pecuária leiteira. Na bovinocultura leiteira o incremento da produtividade demanda cuidados para evitar perda de eficiência reprodutiva e, consequentemente, perda econômica da atividade. Neste cenário, diversos estudos confirmam queda na fertilidade nos rebanhos de elevada produção de leite, com aumento do intervalo entre o parto e a concepção e aumento do intervalo entre partos, com impactos diretos na lucratividade da atividade (YUSUF et al., 2010).

Uma das categorias de reduzida fertilidade nas fazendas leiteiras é a categoria de fêmeas repetidoras de serviço (RS). Tais fêmeas são comumente definidas como animais subférteis, sem quaisquer alterações anatômicas ou anormalidades infecciosas, que não se tornam gestantes mesmo após numerosos serviços (quatro ou mais inseminações; (FERREIRA, 2012). Estima-se que a frequência de vacas RS varia de 9% a 24% entre os rebanhos (BULMAN & LAMMING, 1978; BARTLETT, KIRK, & MATHER, 1986; KURYKIN, WALDMANN, TIIRATS, KAART, & JAAKMA, 2011; YUSUF ET AL., 2010). Vacas RS causam grandes prejuízos econômicos por apresentarem baixas taxas de fertilidade (GRADEN et al., 1968; GUSTAFSSON K., 1985) e/ou perda embrionária precoce (GUSTAFSSON, 1985, LINARES, 1981). Bonneville-Hébert et al. (2011) observaram que a ocorrência de distúrbios reprodutivos no periparto aumenta o risco de incidência de RS em vacas leiteiras. Esses autores verificaram que vacas que tiveram parto distócico apresentam 44% mais risco de se tornar RS. Verificaram, também, que o aumento da paridade foi o fator de maior efeito, sendo que vacas de quarta lactação apresentaram 67% de risco de se tornarem RS. Apesar desses estudos, ainda não está totalmente esclarecido o motivo pelo qual as vacas se tornam RS nem quais seriam os fatores relacionados à queda da fertilidade.

A problemática referente a vacas RS pode abranger três cenários principais: 1) taxa de concepção, 2) comprometimento oocitário e/ou um comprometimento na fase inicial do desenvolvimento embrionário e 3) desordens metabólicas.

Em estudos retrospectivos foram avaliadas a taxa de concepção e a perda gestacional de vacas RS que receberam inseminação artificial (IA) ou transferência de embrião (TE) em diferentes épocas do ano (RODRIGUES, H. et al., 2007; FREITAS et al., 2010). Em um destes estudos, a taxa de concepção de RS em lactação foi superior em vacas que receberam TE (41,7%; 1609/3858) do que vacas que receberam IA (17,9%; 1019/5693; RODRIGUES, H. et al., 2007). Ainda, verificou-se que a perda gestacional (entre 30 e 60 dias de gestação) foi similar entre vacas RS e não RS que foram inseminadas ou receberam embrião (FREITAS C. A. et al., 2010). Esses dados são indicativos de que a baixa taxa de concepção de vacas RS pode estar relacionada a problemas relativos à qualidade oocitária ou ao desenvolvimento embrionário precoce (FERREIRA et al., 2011; BARUSELLI et al., 2011; BARUSELLI et al., 2012). De fato, em estudos mais recentes, foram observadas diversas alterações moleculares (expressão de genes específicos e quantificação de DNA mitocondrial) que são indicativas da ocorrência de comprometimento oocitário em vacas RS exposta ao estresse térmico, comparativamente a outras categorias como novilhas e vacas em início de lactação (FERREIRA et al., 2011, 2016).

A obesidade destaca-se como uma característica que frequentemente está relacionada à queda de fertilidade em RS (SALES, 2011). Para caracterizar as alterações no perfil metabólico e hormonal que possam justificar a queda de fertilidade em vacas RS em lactação foi elaborado um modelo hipotético gráfico.

2. MODELO HIPOTÉTICO

De acordo Bauman e Bruce Currie (1980), nas três semanas iniciais da lactação ocorrem mudanças metabólicas e hormonais, de forma a priorizar a demanda energética requisitada pela glândula mamária (Figura 1 – A). No início da lactação a maior demanda energética para suportar a produção de leite não está sincronizada com o aumento de consumo de matéria seca, resultando em balanço de energia negativo (BEN; OLIVEIRA, 2016). Nessa fase, verifica-se mobilização das reservas corporais que promove a perda de escore de condição corporal (ECC), bem como, a ocorrência de declínio nas concentrações basais de insulina (CHILLIARD et al., 2000; BOSSAERT et al., 2008). Vacas em lactação usualmente apresentam BEN, evento que afeta diretamente a fertilidade no período pós-parto (BUTLER, 2003; BELL, 1995). As vacas com BEN apresentam comprometimento no reinício da atividade ovariana após o parto (LEROY et al., 2008). Verifica-se redução na frequência de pulsos de hormônio luteinizante (LH) e diminuição das concentrações séricas de glicose e insulina (BUTLER, 2000).

Com o avanço da lactação os níveis de insulina aumentam, a produção de leite reduz e a ingestão de alimento retorna ao padrão fisiológico, resultando na recuperação das reservas corporais e aumento do peso vivo corporal (ACCORSI et al., 2005). No terço médio e final da lactação ocorre aporte excessivo de nutrientes, principalmente em vacas repetidoras de serviço, que se tornam obesas (FERREIRA, 2012), com aumento de tamanho (hipertrofia) e número (hiperplasia) de adipócitos (CRESCENZO et al., 2015; LEGEZA et al., 2017).

A RPI ocorre quando há redução na sensibilidade dos tecidos para responder às concentrações fisiológicas de insulina (BOURA-HALFON; ZICK, 2009a). O mecanismo de RPI pode se estabelecer pela diminuição tanto na capacidade de resposta à insulina quanto na sensibilidade à insulina (DE AZEVEDO e COELHO, 2016).

Em vacas, a RPI pode interferir no transporte de glicose no embrião e aumentar a apoptose (SANTOS; et al., 2008) ou reduzir a qualidade do oócito (GONG et al., 2002), depressão da qualidade oocitária e desenvolvimento embrionário (BARUSELLI et al., 2011b, 2016; FERREIRA et al., 2011; SALES, 2011; SALES et al., 2015).

A indução de lactação em vacas secas pode ser utilizada para reverter o quadro metabólico estabelecido (Figura 1 – B). A indução da lactação pode desencadear balanço energético negativo devido ao início da produção de leite. Desta maneira, a nova lactação

pode reverter o quadro metabólico instaurado em vacas RS devido a diminuição do ECC e da concentração circulante de insulina, gerando aumento da sensibilidade à insulina, resultando na melhora da qualidade oocitária e da *PIVE*.

Baseado neste modelo, este estudo se propôs estudar o efeito dos procedimentos de secagem com subsequente indução de lactação sobre a ocorrência de RPI e a *PIVE*. Foi estudada a hipótese de que vacas repetidoras de serviço submetidas à secagem e subsequente indução da lactação reverterem o quadro de RPI e, conseqüentemente, melhoram a qualidade oocitária e a *PIVE*.

Figura 1 – O modelo hipotético demonstra as alterações no perfil metabólico-hormonal durante a lactação e período seco em vacas leiteiras.

No início da lactação a maior demanda energética para suportar a produção de leite não está sincronizada com o aumento de consumo de matéria seca, resultando em balanço energético negativo. Com isso, verifica-se mobilização das reservas corporais que promove a perda de ECC, declínio nas concentrações basais de insulina, aumento da sensibilidade a insulina e depressão da qualidade oocitária na *PIVE*. Com o avanço da lactação, a ingestão de alimento aumenta, resultando na recuperação das reservas corporais e no aumento dos níveis de insulina (Figura 1 – A e B). No terço médio e final da lactação ocorre aporte excessivo de nutrientes, principalmente em vacas repetidoras de serviço, que aumenta significativamente o ECC, ocorrendo elevação das concentrações basais de insulina, diminuição da sensibilidade à insulina e depressão da qualidade oocitária na *PIVE* (Figura 1 – B). Nas vacas RS que finalizaram a lactação vazias, a indução de lactação poderia ser utilizada como estratégia para reverter o quadro metabólico instaurado, promovendo balanço energético negativo, diminuição do ECC e da concentração plasmática de insulina, gerando aumento da sensibilidade à insulina e resultando na melhora da qualidade oocitária e da *PIVE*.

(A) Modelo hipotético das mudanças metabólicas e hormonais com início de lactação após parto fisiológico

(B) Modelo hipotético das mudanças metabólicas e hormonais com início de lactação após protocolo hormonal de indução de lactação

Fonte: Mingoti (2018).

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

A hipótese do presente estudo sugere que a baixa fertilidade de vacas Holandesas (*Bos taurus*) RS está associada à baixa qualidade oocitária que, por sua vez, é agravada pelo quadro de RPI. Ainda, a indução de lactação em vacas Holandesas (*Bos taurus*) RS reverte o quadro de RPI e, conseqüentemente, melhora a qualidade oocitária e a *PIVE*. As hipóteses de cada experimento são:

Experimento I – Resistência periférica a insulina em vacas Holandesas (*Bos taurus*) repetidoras de serviço

Hipótese I: Vacas RS da raça Holandesa (*Bos taurus*) apresentam RPI, baixa qualidade oocitária e baixa *PIVE*.

Objetivo: Avaliar a o estabelecimento do quadro de RPI e a *PIVE* de vacas RS da raça Holandesa (*Bos taurus*).

Experimento II – Resistência periférica a insulina em vacas Holandesas (*Bos taurus*) repetidoras de serviço submetidas a secagem

Hipótese II: A secagem de vacas RS altera o metabolismo, intensificando o quadro de RPI e, portanto, deprimindo a qualidade oocitária e a *PIVE*.

Objetivo: Avaliar o impacto da secagem sobre a RPI e a *PIVE* de vacas RS da raça Holandesa (*Bos taurus*).

Experimento III – Resistência periférica a insulina em vacas Holandesas (*Bos taurus*) repetidoras de serviço não lactantes submetidas a indução de lactação

Hipótese III: A indução da lactação em vacas secas (RS) altera o metabolismo, revertendo o quadro de RPI, melhorando a qualidade oocitária e a *PIVE*.

Objetivo: Avaliar o impacto da indução de lactação sobre a RPI e a *PIVE* de vacas RS da raça Holandesa (*Bos taurus*).

3.1 Objetivos Específicos

Avaliar a RPI de vacas RS da raça Holandesa (*B. taurus*) por meio do teste de tolerância à glicose (TTG).

Avaliar as variáveis bioquímicas glicose, AGNE, β -hidroxibutirato, colesterol, triglicerídeos e ureia presente no plasma e no líquido folicular.

Avaliar a qualidade oocitária e a *PIVE* através da:

- Avaliação morfológica e classificação do oócito obtido (taxa de oócitos recuperados e total de oócitos viáveis);
- Taxa de clivagem; taxa de blastocisto; número de embriões por OPU.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Síndrome metabólica, inflamação, estresse oxidativo e dislipidemia

A síndrome metabólica (SMet), também conhecida como síndrome de resistência à insulina, é caracterizada pelo agrupamento de fatores de risco, como: obesidade, resistência à insulina e dislipidemia (STECKHAN et al., 2016).

Dentre os componentes que classificam SMet, frequentemente observa-se a obesidade. A adiposidade abdominal promove inflamação e estresse oxidativo, precursores de várias complicações envolvendo componentes da SMet, nomeadamente, a resistência à insulina e a hiperlipidemia (YAO et al., 2014; FRANCISQUETI; et al., 2015).

Síndrome metabólica, inflamação & estresse oxidativo

A inflamação e o estresse oxidativo ocorrem quando o suprimento de energia começa a exceder a capacidade de armazenamento dos adipócitos e, como resultado, ocorre hipertrofia dessas células (KLOTING; BLUHER, 2014). Essa hipertrofia leva a uma maior liberação de adipocinas como citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), resultando em inflamação crônica de baixo grau, que se inicia no tecido adiposo e, eventualmente, atinge a circulação e outros órgãos (SKURK et al., 2007; COTILLARD et al., 2014).

Uma das primeiras consequências da inflamação é a resistência à insulina, pois o TNF- α previne a fosforilação dos receptores de insulina, interferindo na ação da cascata e impedindo seu funcionamento (ANDRADE-OLIVEIRA; et al., 2015). A segunda consequência da inflamação é o estresse oxidativo, que pode ser desencadeado pelos adipócitos. Quando o tecido adiposo hipertrofia há o comprometimento da irrigação, que pode levar à falta de oxigênio e, conseqüentemente, à necrose celular. O processo de fagocitose para eliminar essas células mortas resulta no aumento da infiltração de células de defesas, o que gera liberação de radicais livres como o óxido nítrico e o peróxido de hidrogênio (BHATTACHARYA et al., 2015; KOSACKA et al., 2015), agravando o processo inflamatório e, conseqüentemente, a SMet (NETZER et al., 2015).

Comumente conhecidos como radicais livres, os oxidantes incluem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que realizam a oxidação de lipídios (lipoxidação) e da glicose

(glicação), substâncias encontradas em excesso na obesidade. Os produtos de lipoxidação incluem malondialdeído, glioxal, acroleína e 4-hidroxi-nonenal (HNE), enquanto os produtos gerados a partir de glicação incluem glioxal e metilglioxal.

Esses compostos se ligam ao grupo amino de aminoácidos, resultando em produtos finais de glicação avançada (AGEs) e produtos finais avançados de lipoxidação (ALE; (ALDINI et al., 2007), que são altamente reativos e participam do desenvolvimento de outros componentes da SMet. O estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese da resistência à insulina ao promover a liberação de adipocinas pelo tecido adiposo, como o TNF- α e a IL-6, que podem desencadear a inflamação, mecanismo já descrito (HOTAMISLIGIL, 2006; TANGVARASITTICHA, 2015).

Síndrome metabólica & Dislipidemia

Devido a ineficiência da insulina em promover adequada captação de glicose pelos tecidos periféricos e incapacidade em suprimir a gliconeogênese hepática (MADEIRA et al., 2008), a resistência insulínica se caracteriza pela dislipidemia, composta por elevada concentração plasmática de triglicerídeos (TG) (hipertrigliceridemia), baixo conteúdo de lipoproteína de alta densidade (HDL) e alta concentração de lipoproteína de baixa (LDL; TASKINEN, 2003; SHAH et al., 2007; MATIKAINEN; TASKINEN, 2008; FERNÁNDEZ-JULIÁN et al., 2009; HABIB et al., 2009; SALILEW-WONDIM et al., 2015). O desenvolvimento da RPI é acompanhado por hiperinsulinemia (ADAMIAK, 2005; BARUSELLI et al., 2016). Esse quadro é necessário para compensar a diminuição da ação da insulina e para manter a glicose circulante próxima ao normal (REAVEN, 1988).

Apesar da hiperinsulinemia compensatória prevenir quadros exacerbados de hiperglicemia, retardando assim o desenvolvimento ou as manifestações clínicas do Diabetes tipo 2 (Mellitus), ela é responsável por aumentar a concentração plasmática de TG e diminuir o colesterol associado ao HDL (HDL-C; REAVEN, 2005). A HDL rica em TG é avidamente metabolizada pela lipase hepática, e rapidamente retirada da circulação diminuindo, assim, a disponibilidade HDL circulante para participar do transporte de colesterol. Portanto, quanto maior a concentração de LDL, menor será a de HDL circulante (GD; MC; RA, 1997). Em síntese, a obesidade caracterizada pela hipertrofia do tecido adiposo (subcutâneo e abdominal) inicia uma condição de inflamação e estresse oxidativo, precursores de várias complicações envolvendo componentes da SMet, entre elas a RPI e a dislipidemia.

4.2 Mecanismos de liberação de insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico que atua no controle da homeostase glicêmica por meio do estímulo à captação de glicose nos tecidos sensíveis e da inibição da liberação de glicose pelo fígado (KAHN; FLIER, 2000). Esse hormônio é constituído pela cadeia α , que é formada por 21 resíduos de aminoácidos, e ligada por duas pontes de dissulfetos à cadeia β , que por sua vez, é composta por 30 resíduos de aminoácidos (HAGHASSAN; BOURRON; HAJDUCH, 2014).

Segundo De Koster e Opsomer (2013), existem cerca de 13 isoformas de transportadores de glicose (GLUTs), que atuam conforme sua distribuição. Nos tecidos fetais, glândula mamária e fígado, há principalmente, o GLUT-1, que independe de insulina (ZHAO; KEATING, 2007). A expressão do GLUT-1 aumenta entre cinco a cem vezes no início da lactação, permitindo que o úbere, através da corrente sanguínea, consiga consumir grande parte da glicose disponível. Já no úbere não lactante, a presença desse transportador dificilmente é detectada (ZHAO; KEATING, 2007).

Através do GLUT-2, a glicose é transportada para o meio intracelular das células β -pancreáticas, enquanto o tecido muscular esquelético e tecido adiposo dispõem do GLUT-4 para translocar a glicose em resposta ao estímulo provocado pela insulina (HASSAN, 2014; DUHLMEIER et al., 2005; ZHAO; KEATING, 2007). A GLUT-2 possui um Km (15-20mmol/L) e Vmax elevados, permitindo que o transporte de glicose aumente rapidamente quando a glicemia é elevada (HABER et al., 2001).

Conforme Paiva (2014), a insulina armazenada nas células β está empacotada em grânulos densos agrupados de hexâmeros cristalinos de insulina não solúvel. Quando os hexâmeros são secretados das células β ocorre redução no gradiente de concentração de insulina, que favorece a sua dissociação na forma monomérica (PITTMAN, 2014). Tais monômeros representam a forma ativa da insulina e os hexâmetros, a forma de armazenamento (FU, 2013).

O gene da insulina codifica aminoácidos precursores, conhecidos como pré-pró-insulina (PAIVA, 2014). De acordo com (GOULÃO, 2007), as pré-pró-insulinas são clivadas em pró-insulina, no lúmen (LOMEDICO, 1977) do retículo endoplasmático rugoso, formando três pontes de dissulfetos (HUANG, 1995). Após essa formação tridimensional, a pró-insulina é transportada para o complexo de Golgi e é clivada em insulina e peptídeo-C. A insulina é, portanto, armazenada em grânulos que contém insulina-Zn²⁺ (GOULÃO,

2007), peptídeo C, dopamina e outros produtos menos abundantes das células β (NISHI et al., 1990).

A insulina é liberada na circulação sanguínea por exocitose (PAIVA, 2014); que consiste em uma prévia marginalização dos grânulos seguida da junção com a membrana celular e liberação do seu conteúdo para o espaço extracelular (GOULÃO, 2007).

Segundo Haber (2001) e Klover (2004), a ativação da exocitose dos grânulos de insulina ocorre através do aumento da razão ATP/ADP intracelular. Dessa forma, potenciais de ação são gerados pela junção da glicose com os receptores de membrana celular, que levam ao fechamento dos canais K^+ATP e promovem a despolarização da membrana plasmática. Isso promove a abertura dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes e influxo de Ca^{2+} para o interior da célula β .

Apesar do aumento do Ca^{2+} ser o sinal prioritário para a exocitose da insulina (PAIVA, 2014), outros mecanismos atuam como reguladores bioquímicos de sua liberação; como o segundo mensageiro AMPc; aminoácidos arginina e leucina tendem a estimular a secreção de insulina; hormônios como a gastrina, colescistocinina e secretina potencializam a ativação pela glicose (GOULÃO, 2007). A secreção também é estimulada pelo sistema nervoso, através de receptores colinérgicos, bem como a estimulação adrenérgica pode inibir esse mecanismo (MARTINS, 2016).

Existem diversos hormônios, hiperglicemiantes, que contribuem para o aumento da resistência periférica à insulina: hormônio adrenocorticotrófico, hormônio do crescimento e cortisol (GOULÃO, 2007). Admite-se que componentes genéticos também podem determinar a sensibilidade à resistência à insulina (DE KOSTER; OPSOMER, 2013). Molecularmente, a resistência pode ocorrer no pré-receptor, que induz a diminuição da produção e/ou aumento da degradação de insulina; no receptor, que promove a redução destes em número e afinidade de ligação; ou no pós-receptor, que denota uma sinalização intracelular prejudicada (HAYIRLI, 2006).

No período de transição das vacas leiteiras, ocorre uma ineficiência de consumo de matéria seca (CMS; LAGO et al., 2004), que induz os animais a um quadro de balanço energético negativo (BEN; ESPOSITO et al., (2014). Nessa fase, a demasiada mobilização das reservas corporais promove à perda de escore de condição corporal (ECC) dessas fêmeas, bem como a ocorrência de um declínio nas concentrações basais e de secreção de insulina, induzida pela glicose (BOSSAERT et al., 2008).

4.3 Resistência periférica a insulina em bovinos leiteiros

De acordo com Bauman e Bruce Currie (1980), nas três semanas finais de gestação e iniciais da lactação ocorrem mudanças metabólicas e hormonais, de forma a priorizar a demanda energética requisitada pela gestação e pela glândula mamária. Durante este período, leiteiras passam de um estado gestante e não lactante para um estado não gestante e lactante, e uma série de mudanças ocorrem em seu metabolismo para suportar a produção de leite. No início da lactação a maior demanda energética para suportar a lactação não está sincronizada aos aumentos de consumo de matéria seca, resultando em BEN (OLIVEIRA, 2016).

Vacas leiteiras usualmente apresentam balanço energético negativo (BEN), circunstância que afeta intimamente a fertilidade (BUTLER et al., 2003). As vacas com BEN apresentam menos nutrientes requeridos para a ciclicidade reprodutiva (LEROY et al., 2008), e por consequência, há redução na frequência de pulsos de hormônio luteinizante (LH) e diminuição das concentrações séricas de glicose e insulina (BUTLER, 2000).

Conforme Beam e Butler, (1998), altas concentrações de insulina no pós-parto antecipam a primeira ovulação de vacas leiteiras. A administração de insulina eleva os níveis de IGF-I intrafolicular (GONG et al., 1997) e o tamanho dos folículos (SIMPSON et al., 1994), estimula a proliferação *in vitro* das células da granulosa e da teca (ALVAREZ et al., 2000) e reduz a atresia de folículos (MATAMOROS; COX; MOORE, 1991).

Com o avanço da lactação os níveis de insulina aumentam, a produção de leite reduz e a ingestão de alimento retorna ao padrão fisiológico, resultando na recuperação das reservas corporais e no aumento do peso vivo corporal (HEUER; SCHUKKEN; DOBBELAAR, 1999; SINCLAIR, 2010; NRC, 2001; SALES, 2011). No terço médio e final da lactação ocorre aporte excessivo de nutrientes, principalmente em vacas repetidoras de serviço, que se tornam obesas, com aumento de tamanho (hipertrofia) e número (hiperplasia) de adipócitos. Com esse quadro estabelecido, ocorre inflexibilidade do tecido adiposo para se expandir, tornando-se disfuncional (CRESCENZO et al., 2015; LEGEZA et al., 2017).

A resistência periférica à insulina (RPI) ocorre quando há redução na sensibilidade dos tecidos para responder as concentrações normais de insulina (BOURA-HALFON; ZICK, 2009b). O mecanismo de resistência pode ocorrer devido a capacidade de resposta à insulina e/ou sensibilidade à insulina (DE AZEVEDO e COELHO, 2016).

O trabalho de De Koster e Opsomer (2013) representa a cinética química de RPI, de forma que se houver uma redução da capacidade de resposta à insulina, há uma queda da curva de dose-resposta da mesma. De antemão, a diminuição na sensibilidade à insulina consiste em um desvio para a direita da curva de dose-resposta da insulina, isto é, alta dose desse hormônio é necessária para produzir resposta de metade-máxima da concentração de glicose no sangue (KAHN, 1978; OIKAWA; OETZEL, 2006; BOSSAERT et al., 2009).

A insulina apresenta uma variedade de respostas biológicas, uma vez que possui vários locais de atuação. Logo, o resultado da diminuição da sensibilidade à insulina depende do tecido envolvido. No fígado, a insulina inibe a glicólise, glicogenólise e gliconeogênese, e nos músculos, ela estimula a exteriorização do GLUT-4 e o processamento intracelular de glicose. Já no tecido adiposo, o efeito da resistência é reforçado pelo GLUT-4 e pela inibição do hormônio-sensível a lipase (BOSSAERT et al., 2009b).

O tecido adiposo é um órgão funcionalmente heterogêneo. Há dois tipos principais, o tecido adiposo periférico (TAP) e tecido adiposo visceral (TAV). O TAP, representado por regiões como subcutânea, mamária e retroperitoneal, apresenta atividade metabólica moderada e são mais sensíveis à insulina. O TAV, por sua vez, possui atividade altamente metabólica e são menos sensíveis a insulina; são estes que apresentam maior comportamento de RPI (FLUMIGNAN, 2008). O efeito da resistência nesse tecido é reforçado pelo GLUT-4 e pela inibição do hormônio-sensível a lipase (BOSSAERT et al., 2009a).

Na fase final da gestação e de início da lactação, a resistência à insulina é algo comumente aceito (DE KOSTER; OPSOMER, 2013) e estas adaptações são necessárias para garantir fornecimento de glicose satisfatória para o feto e para a glândula mamária em lactação (BAUMAN; BRUCE CURRIE (1980).

Segundo Bazer (1975), a distribuição de nutrientes entre a mãe e o feto durante a gestação, e coordenada pelo lactogênio placentário bovino (bPL), também contribui com a ocorrência de RPI. O bPL é produzido nas células trofoblásticas binucleadas da placenta de ruminantes, e atua nas mudanças fisiológicas durante a gestação (IGWEBUIKE, 2006), como no desenvolvimento das glândulas uterinas e mamárias. Ao contrário do músculo esquelético e do tecido adiposo, os tecidos fetais realizam um processo insulín-dependente para o transporte de glicose (HAYIRLI, 2006).

Em condições fisiológicas normais, a insulina reduz a produção de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e betahidroxibutirato (BHB) pelo fígado, estimula o transporte de glicose para o interior das células (LAWRENCE; MCKERN; WARD, 2007), inibe a lipólise

e aumenta o uso de corpos cetônicos em tecidos periféricos (BROCKMAN; LAARVELD, 1986).

Embora a redução da concentração de insulina periférica seja uma estratégia importante, a supressão crônica de sua secreção pode resultar em excessiva lipólise, gerando rápido aumento de AGNEs e aumentando os distúrbios metabólicos durante o período de transição (GONZÁLEZ et al., 2011). Exemplos disso são vacas com elevado (>4) ECC e alto depósito de gordura visceral, que próximo ao parto apresentam alta mobilização de AGNE e tornam-se hiperinsulinêmicas e resistentes à ação da insulina.

Quando a capacidade hepática de oxidar AGNE é suprimida e há formação de corpos cetônicos em altas concentrações, como o composto BHBA (SMITH et al., 1997), o animal pode atingir a condição de cetose, que associada a outras desordens metabólicas, pode provocar subfertilidade (SINCLAIR, 2010). Vacas em estágio avançado de lactação também podem sofrer os efeitos negativos da RPI; por enfrentar um longo período de alta ingestão alimentar antes da concepção, podem se tornar vacas repetidoras de serviço (OLIVEIRA, 2016).

4.4 Associação da RPI com a fertilidade

Vacas leiteiras com elevado intervalo parto concepção possuem maiores riscos de descarte e estão frequentemente associadas a distúrbios metabólicos (CHASSAGNE; BARNOUIN; CHACORNAC, 1999; HEUER; SCHUKKEN; DOBBELAAR, 1999; PINEDO; DE VRIES, 2010). O consumo excessivo de energia é comum em vacas leiteiras no terço final de lactação (LEIVA et al., 2015a). Vacas leiteiras no terço final de lactação possuem maiores chances de se tornarem obesas (aumento do ECC), uma vez que, nessa fase a produção de leite normalmente é menor, embora o consumo de ração não seja reduzido de acordo (HEUER; SCHUKKEN; DOBBELAAR, 1999; SINCLAIR, 2010).

A ingestão excessiva de energia pode alterar a liberação e a síntese de hormônios reprodutivos e metabólicos, a qualidade dos oócitos e a dinâmica folicular ovariana, resultando em prejuízo no desempenho reprodutivo durante esse estágio (ARMSTRONG; GONG; WEBB, 2003; SINCLAIR, 2010).

Dentre os distúrbios metabólicos relacionados às vacas no terço final da lactação está o desenvolvimento de resistência periférica à insulina (SINCLAIR, 2010; DE KOSTER; OPSOMER, 2013; LEIVA et al., 2015b), caracterizada pela diminuição da sensibilidade dos tecidos-alvo às concentrações normais de insulina circulante (BOURA-HALFON; ZICK, 2009b), exigindo maiores concentrações de insulina para alcançar respostas metabólicas normais (HOLTENIUS; HOLTENIUS, 2007). Mulheres com hiperinsulinemia crônica podem ter comprometimento da captação de glicose, o que leva à apoptose celular (PANTALEON; KAYE, 1998; CHI; SCHLEIN; MOLEY, 2000). Além disso, a resistência à insulina tem associações negativas com a reprodução de novilhas e vacas secas, resultando em comprometimento da qualidade do oócito (ADAMIAK, 2005; SALES et al., 2015).

Embora a insulina tenha um papel importante no metabolismo celular, em excesso pode interferir em vários processos metabólicos e reprodutivos em vacas leiteiras (DE KOSTER; OPSOMER, 2013). Durante o início da lactação, concentrações baixas de insulina circulante têm sido associadas com comprometimento da fertilidade, retardando a retomada da ciclicidade (GONG et al., 2002). Embora concentrações maiores de insulina sejam importantes para restaurar a ciclicidade ovariana, foi demonstrado em novilhas que a hiperinsulinemia pode comprometer a qualidade do oócito (ADAMIAK, 2005) e, portanto, a fertilidade.

A hiperinsulinemia pode reduzir a qualidade dos oócitos em novilhas (ADAMIAK, 2005), a produção *in vitro* de embriões (*PIVE*) e a expressão gênica ligada ao metabolismo celular em vacas leiteiras *Bos indicus* não-lactantes (SALES, 2011). Neste último estudo, a associação negativa do consumo excessivo de energia e o aumento das concentrações de insulina na *PIVE* ocorreu somente após 60 dias de tratamento. Assim, a exposição prolongada a uma dieta de alta energia foi necessária para comprometer a qualidade do oócito. Com base na “teoria de Britt” (isto é, a foliculogênese leva pelo menos 60-80 dias entre o recrutamento de folículos primordiais até o estágio de folículo ovulatório; BRITT, 1992), condições adversas como balanço energético excessivo pode levar ao estabelecimento do quadro de RPI que poderia afetar a foliculogênese, levando a subsequentes problemas na competência oocitária e falhas na ovulação.

4.5 Indução de lactação

O objetivo principal de uma propriedade leiteira deve ser a maximização dos lucros, como forma de manter a atividade economicamente sustentável e rentável. Para alcançar a meta, o produtor deve conhecer os fatores que influenciam a diminuição da produtividade leiteira, muitas vezes sendo necessário o descarte de animais. Entretanto, boa parte das propriedades não realiza um planejamento de descarte animal, fazendo-o de forma aleatória e aumentando a taxa de descarte involuntário (SILVA, 2008).

Um estudo com 2083 bovinos leiteiros mostrou que alterações no aparelho reprodutor representaram 27,7% do total de descarte de animais das propriedades avaliadas (SILVA, 2008). Disfunções reprodutivas incidem diretamente na diminuição do número de vacas lactantes no rebanho e consequentemente, afeta a produção de leite ao ano (FREITAS et al., 2010).

Algumas medidas podem ser adotadas com a finalidade de diminuir a taxa de descarte involuntário. A indução da lactação em vacas secas é uma ferramenta que o produtor pode utilizar para atingir esse objetivo, aumentando a vida produtiva desses animais e consequentemente, trazendo maior lucratividade (JEWELL, 2002; FREITAS et al., 2010).

Os primeiros protocolos de indução de lactação utilizavam estrógeno e progesterona, isolados ou combinados, para desenvolvimento da glândula mamária e início da produção de leite. Porém, esses protocolos eram muito extensos (120 a 180 dias de aplicações hormonais), resultavam em baixa produção de leite e possuíam baixa taxa de sucesso (HANCOCK; BRUMBY; TURNER, 1954; TURNER; YAMAMOTO; RUPPERT JR., 1956).

Com os avanços da pesquisa, novos protocolos surgiram, trazendo menor duração de tratamento, maior produção de leite e ainda atingindo maiores taxas de sucesso. Novos hormônios e fármacos foram adicionados aos antigos protocolos que empregavam somente estradiol e progesterona, como a prolactina, alguns glicocorticoides e a prostaglandina F2 α (JEWELL, 2002).

Sabe-se que existe um sinergismo entre o estrógeno e a progesterona que estimula o desenvolvimento lóbulo-alveolar da glândula mamária. Porém, os altos níveis de progesterona durante a prenhez são responsáveis pela regulação do desenvolvimento mamário e por bloquear a lactogênese. O bloqueio da lactogênese pela progesterona ocorre de diversas maneiras, como quando esse hormônio se liga aos receptores de glicocorticoide

mamários, impossibilitando a ação lactogênica do glicocorticoide. Mas é o declínio da progesterona, quando o parto se aproxima, que permite o aparecimento da lactogênese. E, após estabelecida a lactação, a aplicação de progesterona não tem efeito sobre a produção de leite (TUCKER, 2000).

Estudos mostraram ainda que a associação de estrógeno e progesterona era responsável por cerca de 73% do desenvolvimento mamário, levando a conclusão de que existem outros fatores que contribuem para a plena lactogênese durante a prenhez (SUD; TUCKER; MEITES, 1968; TUCKER, 2000). Descobriu-se então que a prolactina possuía papel criticamente importante para o início da lactação no período periparto em diversas espécies, incluindo nos bovinos (TUCKER, 2000). O pico de prolactina que ocorre antes do parto é aparentemente necessário para a total lactogênese (JEWELL, 2002).

O cortisol é o glicocorticoide endógeno mais abundante nos bovinos, e a sua função na glândula mamária é a diferenciação do sistema lóbulo-alveolar. Essa diferenciação é essencial para que, posteriormente, a prolactina induza a síntese das proteínas do leite (TUCKER, 2000).

Ainda, muitos protocolos lançam mão do uso de prostaglandina F_{2α} para promover a luteólise e sincronizar o ciclo reprodutivo. Iniciar um protocolo de indução de lactação com todos os animais em uma mesma fase do ciclo reprodutivo pode diminuir a variação de produção de leite entre as vacas, que pode estar relacionada às diferenças nas concentrações endógenas de estrógeno, progesterona, prolactina e glicocorticoides. Ainda, removendo a fonte de progesterona (corpo lúteo), há impedimento de que esse hormônio compita com os glicocorticoides pelos sítios de ligação da glândula mamária, tornando os animais mais responsivos ao glicocorticoide exógeno do protocolo (FULKERSON, 1978; JEWELL, 2002).

Larry Smith e Schanbacher (1973) mostraram que a lactação pode ser induzida em um período de 7 dias de tratamento utilizando 17β estradiol e progesterona. O tratamento mimetiza os altos níveis desses esteroides observados durante o último mês de gestação em bovinos, quando ocorre um desenvolvimento significativo da glândula mamária. A produção de leite foi variável, variando de 63 a 106% da lactação anterior. Estudos referenciais demonstram grandes variações na produção de leite das vacas em lactação induzidas por protocolos hormonais. Desde então, vários estudos têm demonstrado a produção de leite em animais com lactação induzida a ser de 60 a 70% de rendimento em relação a lactação anterior (LARRY SMITH; SCHANBACHER, 1973; COLLIER; BAUMAN; HAYS, 1975;

KENSINGER; BAUMAN; COLLIER, 1979; BYATT et al., 1994). Fowler et al., (1991) propuseram que a produção de leite de animais com lactação induzida mais baixa que o normal foi o resultado da proliferação incompleta de tecido mamário em vez de diferenciação inadequada de células secretoras.

Quanto aos resíduos hormonais no leite, Jewell (2002) relatou níveis de progesterona inferiores a 1,5 ng/ml entre os dias 2 e 8 após o início da lactação. Os níveis de progesterona observados foram inferiores aos obtidos no leite de vacas cíclicas. Dados similares foram reportados por ERB et al., (1976), que também demonstraram que os níveis de estradiol no leite estão dentro da normalidade dois dias após o início da lactação, demonstrando que o leite produzido não oferece risco ao consumidor quanto aos níveis desses esteroides.

4.5.1 Indução de lactação vs. fertilidade

Além de possibilitar lactação na ausência de gestação, o protocolo hormonal utilizado para a indução permite que algumas vacas retornem à reprodução. Há relatos de vacas repetidoras de serviço que apresentavam cistos ovarianos, metrite, histórico de aborto e outros transtornos, que se tornaram gestantes após submetidas ao protocolo de indução de lactação, evitando, assim, o descarte precoce (LARRY SMITH; SCHANBACHER, 1973; JEWELL, 2002; FREITAS et al., 2010; MELLADO et al., 2011).

Em um estudo realizado no Brasil, que utilizou vacas Holandesas com problemas reprodutivos, 41,4% (12/29) das fêmeas se tornaram gestantes após serem submetidas a protocolos de indução lactação, embora apenas oito mantiveram a gestação a termo (FREITAS et al., 2010). Jewell (2002) obtiveram 66% de prenhez (21/32) em vacas secas repetidoras de serviço após serem submetidas a protocolo de indução da lactação. Em outro estudo utilizando 98 vacas induzidas artificialmente para produção de leite, que falharam em conceber anteriormente, não foi observada diferença significativa na taxa de prenhez em comparação com 81 vacas paridas naturalmente (71% vs. 75% de prenhez, respectivamente; MELLADO et al., 2006).

Carvalho et al., (2016) avaliaram a fertilidade de vacas Holandesas (*Bos taurus*) repetidoras de serviço (RS) que permaneceram vazias ao final da lactação e foram tratadas com protocolo hormonal de indução de lactação. O estudo analisou dados retrospectivos de vacas que iniciaram uma lactação fisiológica após um parto (Grupo LF; N = 50, Paridade = $2,0 \pm 0,1$ lactações), permaneceram não gestantes ao final desta lactação e tiveram uma nova lactação induzida por protocolo hormonal (Grupo IL; N = 50; Paridade = $3,0 \pm 0,1$). Os autores verificaram diferença taxa de prenhez durante a lactação (LF = 0%; IL = 41,5%; $P < 0,0001$); duração da lactação (LF = 389 ± 14 ; IL = 269 ± 13 dias; $P < 0,0001$) e produção de leite durante a lactação (LF = 8484 ± 338 ; IL = 5778 ± 392 kg; $P < 0,0001$).

Em outro estudo realizado no Brasil, 106 novilhas Jersolando (Jersey vs. Holandês) foram expostas ao protocolo de indução de lactação. Os autores verificaram elevada taxa de prenhez (76,1%) após três protocolos de IATF em intervalos de 30 dias (Dados não publicados – MINGOTI, 2016).

Apesar de todos os esforços, o melhor estímulo para produção de leite continua sendo a prenhez (TUCKER, 2000). Todavia, o uso de hormônios exógenos tenta ao máximo mimetizar a produção hormonal endógena da vaca prenhe, fazendo com que os protocolos

de indução da lactação alcancem resultados satisfatórios, sendo economicamente viável o uso dessa tecnologia ao invés do descarte dos animais e posterior gastos com a reposição (JEWELL, 2002).

Experimento I

*Resistência periférica a insulina em
vacas Holandesas (Bos taurus)
repetidoras de serviço*

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos no uso de animais

O presente estudo está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (aprovado sob o protocolo de número 8510170714).

5.2 Local, período de execução e origem dos animais

O projeto foi realizado entre os meses de fevereiro de 2016 e março de 2016, na fazenda Palmeiras do Instituto de Zootecnia (IZ-APTA), localizada no município de Nova Odessa - SP -Brasil

5.3 Animais e Instalações

Trinta fêmeas bovinas da raça Holandesa (*Bos taurus*) foram utilizadas nesse experimento. Os animais permaneceram em sistema de estabulação livre do tipo “*open lot*” (bairas de estabulação livre com acesso a piquetes para pastejo de capim braquiária - *Brachiária decumbens*) com acesso a água *ad libitum* (estabelecido na propriedade). A alimentação, era composta por silagem de milho e concentrado a base de soja e milho, suficientes para suprir ou sobrepor os requerimentos nutricionais de vacas leiteiras em lactação (NRC 2001). As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia.

5.4 Grupos Experimentais, Randomização e Unidade Experimental

O presente experimento foi delineado um ensaio inteiramente casualizados utilizando arranjo de três tratamentos experimentais. Os grupos e critérios de seleção adotados para criação dos grupos experimentais foram:

1. Vacas no terço inicial da lactação (IL; n=10);
 - Multíparas; $DEL \geq 90$ dias (terço inicial da lactação); nenhum evento reprodutivo ($IA=0$) e $ECC > 2,75$;
2. Vacas repetidoras de serviço (FL-RS; n=10);
 - Multíparas; $DEL \geq 300$ dias (terço final da lactação); $IA \geq 3$ e $ECC \geq 3,00$;
3. Vacas no terço final da lactação – prenhas (FL-P; n=10).
 - Multíparas; $DEL \geq 300$ dias (terço final da lactação); $ECC \geq 3,00$ e prenhez entre 45 e 120 dias.

5.5 Delineamento Experimental

Figura 2 - Delineamento experimental para aspiração folicular da *PIVE*, coleta de líquido folicular e TTG em vacas Holandesas (*Bos taurus*); *PIVE* = produção *in vitro* de embriões; FF – Coleta de líquido folicular; TTG – Teste de tolerância a glicose.

Fonte: Mingoti (2018).

5.6 Desenho experimental

Figura 3 - Desenho Experimental – Resistência periférica a insulina em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação e vacas no terço final da lactação (repetidora de serviço e vacas prenhez).

Fonte: Mingoti (2018).

5.7 Procedimentos Experimentais

5.7.1 Aspirações folicular guiada por ultrassonografia (OPU)

A OPUs foram realizadas na própria fazenda pelo médico veterinário Bernardo Marcozzi Bayeux, da empresa Bovigênese - Reprodução Animal. Os materiais da OPU, bem como os procedimentos para a realização da *PIVE* foram cedidos e realizados pela empresa WTA-FIV, sob coordenação da médica veterinária Yeda Fumie Watanabe.

As OPU para *PIVE* (OPU/*PIVE*) foram realizadas em um dia aleatório do ciclo reprodutivo das vacas utilizadas. As vacas foram contidas em um brete e submetidas à anestesia epidural (espaço sacrococcígeo) utilizando 5,0ml de lidocaína a 2%.

Todos os folículos visíveis (≥ 3 mm) foram puncionados. As OPU foram realizadas com um sistema com agulha descartável (20 G; 0.9 x 50 mm; Terumo, Europe NV, Belgium), acoplado à linha de aspiração de Teflon de 1,7mm de diâmetro e 110 cm de comprimento (WTA, Cravinhos-SP, Brasil).

Todo o sistema de aspiração foi submetido à pressão negativa entre 12 a 15 mL de água/minuto (85 a 90 mmHg) produzida por uma bomba de vácuo com aquecedor de tubo de 50 mL (WTA, Cravinhos, SP, Brasil).

Os folículos visíveis (≥ 2 mm) foram puncionados e o líquido contendo os oócitos foi colhido em tubo cônico de 50 mL (Corning), contendo 15 mL de PBS (DPBS; Nutricell Nutrientes Celulares®), e heparina sódica (5000UI/ L (Parinex®, Hypolabor) mantido a 37°C. O tubo de coleta foi conduzido ao laboratório de campo e o conteúdo aspirado foi vertido em filtro coletor para FIV com malha de 75 μ m (WTA, Cravinhos) e lavado com o mesmo meio descrito anteriormente até obtenção de um líquido translúcido, com o sedimento contendo os oócitos recuperados. Em seguida, o conteúdo do filtro foi vertido em placas de cultivo celular 60 mm contendo DPBS acrescido de heparina a 37 °C para a realização da procura, lavagem, classificação e seleção dos CCOs (complexos *cumulus*-oócito) com auxílio de lupa estéreo microscópica (OPTIKA) com aumento de 8-20X.

Os CCOs foram morfológicamente classificados como viáveis ou inviáveis de acordo com as características citoplasmáticas do oócito e o número de camadas de células do *cumulus*. CCOs compactos com mais de três camadas de células do *cumulus* e oócitos com citoplasma homogêneo (grau I), CCOs compactos com três camadas ou menos de células do *cumulus* e oócitos com citoplasma levemente heterogêneo (grau II) e CCOs parcialmente

desnudos e oócitos com citoplasma heterogêneo (grau III) foram considerados viáveis para a *PIVE* e utilizados nesse estudo. Oócitos desnudos ou degenerados, oócitos desprovidos de células do *cumulus* na maior parte da superfície da zona pelúcida ou com citoplasma retraído e vacuolizado, e CCOs com células do *cumulus* expandidas foram considerados inviáveis para a *PIVE* (WRIGHT, 1998) e descartados desse estudo.

Após a classificação, os CCOs foram lavados em solução de TCM 199 (Gibco) suplementado com 10% SFB (Gibco) e uma vez em meio de maturação (TCM 199 suplementado com 10% SFB, 5 µg/ml FSH, 50 µg/ml LH e 01 µg/ml de estradiol). Em seguida foram transportados para um microtubo (WTA) com meio de maturação (MIV) sob óleo mineral (500µl MIV + 400µl óleo). Os microtubos foram levados em transportadora de oócitos - Labmix (WTA®) com temperatura de 38.5°C e atmosfera gasosa controlada (6%CO₂ + 5%O₂ + 89%N₂), sendo realizada a maturação durante o transporte com uma pressão hidrostática controlada de 15mmHg (Labmix).

5.7.2 Maturação *in vitro*

Os CCOs obtidos foram selecionados de acordo com o seu grau de qualidade, sendo utilizados CCOs com ou sem células do *cumulus*, mas de aspecto de granulações citoplasmáticas homogêneas. Na chegada ao laboratório os microtubos com os CCOs foram transferidos para incubadora de bancada (EVE WTA®).

5.7.3 Fertilização *in vitro*

Para a fertilização *in vitro* foi utilizado sêmen sexado para fêmeas do touro EROS TE (F) RGD: RRP 5692, partida 13/05/14 da raça Gir Leiteiro previamente testado para *PIVE*. Em todos os experimentos, foram mantidas touro e mesma partida de sêmen, assim como, o técnico responsável pelo processo de *PIVE*. As palhetas de sêmen de 0,25 mL foram descongeladas em banho-maria a 35°C por 30 segundos e centrifugadas a 1200 rpm por 30 minutos em gradiente de Percoll para obtenção dos espermatozoides móveis e remoção do diluidor e do plasma seminal. O pellet formado foi pipetado, tomando-se o cuidado de retirar o máximo possível do Percoll, e seu volume foi calculado.

A concentração foi ajustada para 1×10^6 spz/mL. O meio utilizado na fecundação *in vitro* foi o meio Tyrode modificado (TALP) acrescido de soluções de Penicilamida, Hipotaurina e Epinefrina (PHE) e 10 µg/mL de heparina. Os gametas permaneceram incubados em placas com micro gotas de 70 µL cobertas com óleo mineral, por 20-22 horas a 38,5°C com baixa tensão de oxigênio.

5.7.4 Cultivo *in vitro*

Após o tempo de incubação dos gametas, os prováveis zigotos foram lavados para retirar o excesso de células do *cumulus* e transferidos para uma placa contendo micro gotas de 70µL de meio de cultivo (CR2 modificado acrescido de SFB e BSA), cobertos por óleo mineral de acordo com os protocolos de Watanabe 1998. Estes permaneceram na incubadora de bancada (EVE – WTA®) por um período de 7 a 9 dias mantidos a temperatura de 38,5°C com baixa tensão de oxigênio (6:5:89) e pressão hidrostática de 5mmHg.

Após 72 horas da inseminação (hpi) foi realizado o primeiro feeding (troca de 50% do meio) e a contagem dos zigotos clivados (número de estruturas clivadas/número de oócitos viáveis). E após 120 hpi realizou-se o segundo feeding. A taxa de blastocisto foi realizada em D7 (número de embriões produzidos/número de oócitos viáveis). Os blastocistos em D7 classificados como embriões de boa qualidade foram submetidos a técnica de vitrificação de acordo com a metodologia de Watanabe et al, 2014.

5.8 Coletas de sangue, líquido folicular, análise metabólica e hormonal

Após as OPUs foram coletadas amostras de sangue em 3 tubos de vácuo de 10 ml (Vacutainer®, Becton-Dickinson e Company, EUA), sendo um com fluoreto de sódio e dois sem anticoagulante. O plasma e soro foram separados por centrifugação durante 10 minutos. (3000 rpm por 10 minutos, Centrífuga Excelsa Baby®, Fanem, Brasil) O soro e plasma separados foram acondicionados em tubos esterilizados (Tubos Eppendorf 3810X standard®, Eppendorf, Alemanha) com identificação e em seguida, armazenados em freezer a -21°C até posterior análise das variáveis metabólicas. Na avaliação metabólica sanguínea, foram analisadas as concentrações de glicose, colesterol total, colesterol (CHDL), colesterol (CLDL), triglicerídeos e nitrogênio ureico no plasma e insulina no soro sanguíneo.

Ao final de cada OPU, foi introduzido um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (CIDR®, Pfizer Saúde Animal, Brasil), para sincronização do crescimento da onda folicular. Sete dias após a OPU foi efetuada a aspiração para coleta de líquido folicular do folículo dominante (OPU/FF). O procedimento de aspiração foi semelhante ao descrito no item 5.7.1 pág 47 “Aspirações folicular guiada por ultrassonografia (OPU)”. No entanto, alguns ajustes foram efetuados, tais como: o conteúdo aspirado foi direcionado para um tudo de 5 ml e, ao final da aspiração, o sistema foi lavado com 2 mL de cloreto de sódio.

Após esses procedimentos, o líquido folicular foi aferido e armazenado em tubo plástico (Tubos Eppendorf, Alemanha) com identificação, e em seguida, armazenado em freezer a -21°C para posterior análise.

5.9 Análise metabólica e hormonal

A determinação dos teores de glicose plasmática das amostras foi realizada por método enzimático colorimétrico, utilizando o kit CAT 02200 (Laborlab®, Guarulhos, Brasil), adaptado para leitura em tubos no aparelho do tipo espectrofotômetro com comprimento de luz de 500 nm. No método proposto por Trinder (1969), a glicose é oxidada a peróxido de hidrogênio e a reação deste com 4-aminoantipirina e fenol formam a quinoneimina, um composto de cor rosa.

O teor de colesterol sérico e do líquido folicular foi quantificado por metodologia enzimática colorimétrica, em Analisador Bioquímico modelo AMS (Liasys®, Itália) utilizando-se kit comercial (Biosystems®, Espanha).

A concentração de CHDL foi determinada em duas etapas, sendo a primeira envolvendo preparação prévia das amostras e a segunda a análise propriamente dita. Para a realização da análise da concentração de CHDL, 200µl das amostras foram pipetados em tubos Eppendorff de 2,5 ml, juntamente com 100µl do reativo único precipitante (Celm®-1763) na proporção de 2:1 e misturados manualmente por inversão suave durante 20 segundos. Em seguida as amostras foram deixadas em repouso por 10 minutos. Posteriormente, as amostras preparadas foram centrifugadas durante 15 minutos a 2700g. Nos volumes centrifugados restaram as moléculas de CHDL ligadas ao colesterol sendo estas analisadas por sistema bioquímico automático (SBA-200).

A concentração de ureia sérica e do líquido folicular foi determinada por método enzimático colorimétrico, descrito por Henry, Cannon e Winkelman (1974), utilizando o kit CAT 02800 (Laborlab®, Guarulhos, Brasil) adaptado para leitura em tubos no aparelho do tipo espectrofotômetro com comprimento de luz de 620 nanômetros. Em seguida as concentrações de ureia foram multiplicadas pelo fator 0,467 (Hallet; Cook, 1971) para obtenção dos teores de nitrogênio advindos da ureia.

5.9.1 Análise de insulina

A metodologia para a mensuração quantitativa de Insulina bovina (b-Insulina), assim como, a avaliação da precisão do ensaio com os valores de Intra-ensaio e Inter-ensaio estão apresentados nos *ANEXOS* (p. 129).

5.10 Teste de Tolerância à glicose (TTG)

Um dia após a OPU/FF foi realizado o teste de tolerância à glicose (TTG), com o intuito de determinar o perfil de insulina durante 120 minutos. Antes de iniciar o teste, um cateter flexível de 18 gauge (BD Angiocath®, Becton, Dickinson e Company, EUA) foi introduzido na veia jugular de todas as vacas. O TTG teve início 5 horas após o fornecimento das dietas segundo estudo proposto por Adamiak et al. (2005). Três amostras de sangue, com intervalo de 10 minutos (-20, -10 e 0 minutos) foram colhidas antes da infusão de glicose, com o objetivo de estabelecer as concentrações basais de glicose e insulina. Os animais receberam por infusão *i.v.* aproximadamente 0,3 g/kg de solução estéril de glicose [Glicose 50% (p/v)] durante 5 minutos, seguido por coletas de sangue aos 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos após a infusão de glicose. Todas as amostras foram coletadas em tubos ao vácuo de 4 ml (Vacutainer®, Becton-Dickinson e Company, EUA) contendo fluoreto de sódio. Os mesmos procedimentos de manipulação e armazenamento do sangue e análises de glicose e insulina descritos no item 5.8 pág 50 “*Coletas de sangue, líquido folicular, análise metabólica e hormonal*”. O TTG foi realizado para calcular a taxa de metabolismo (k) e a taxa de depuração da glicose ($T_{1/2}$) glicose plasmática. O valor de k foi calculado pela fórmula: $k = ((\ln [\text{glicose}]_{T10} - \ln[\text{glicose}]_{T40}) / (T40 - T10)) * 100$, de acordo com Opsomer et al. (1999), sendo $\ln [\text{glicose}]$. Utilizando o valor de k, a taxa de depuração da glicose foi calculada: $T_{1/2} = (0,693/k) * 100$. A resposta da insulina após a administração de glicose foi avaliada pelo pico de concentração e incremento de insulina ([insulina] no pico - [insulina] basal; $\Delta \text{Máx.}$). As áreas sob a curva (AUC) de glicose e insulina durante o GTT foram calculadas usando o método trapezoidal (Opsomer et al., 1999). AUC 5–60 = área sob a curva para concentração de insulina no intervalo de 5 a 60 minutos; AUC 5–120 = área sob a curva para concentração de insulina no intervalo de 5 a 120 minutos.

5.11 Sensibilidade a insulina

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura diagnosticam a RPI em vacas leiteiras a partir da concentração de circulante de insulina e glicose, utilizando os testes de HOMA, Log10HOMA, HOMA-1, QUICKI, RQUICKI e RQUICKI-BHB (ALVES-NORES et al., 2017). Esses autores verificaram que tais índices são derivados de pesquisas com base em humanos e não parecem adequados para avaliar a sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina em vacas leiteiras no início da lactação. Entretanto, Sales (2011) caracterizaram a RPI levando em consideração a maior secreção de insulina [pico, insulina (Δ máx.) e AUC] em resposta ao tratamento com glicose (TTG). Contudo, as alterações da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos podem ser determinadas por dois fatores: 1) a maior secreção de insulina em resposta à infusão de glicose (SALES, 2011; OLIVEIRA et al., 2016) e 2) menor captação de glicose, mesmo após o aumento da secreção de insulina (OLIVEIRA et al., 2016). Esses dois fatores foram utilizados como diagnóstico da RPI neste estudo. São eles:

- Quantidade de insulina secretada por unidade de glicose (1) e % de secreção de insulina por mg de aumento glicêmico (2).
 1. $(\Delta \text{ máx Insulina, } \mu\text{IU} \times 100 \text{ mL/dL}) / (\Delta \text{ máx Glicose mg/dL})$
 - a. $\mu\text{IU insulina secretada} / \text{mg de aumento glicêmico}$
 2. $(\text{Secreção de Insulina}_{\text{GrupoA}} / \text{Secreção de Insulina}_{\text{GrupoB}}) * 100$
- Quantidade de glicose captada durante os primeiros 120 min do TTG (1) e % de captação de glicose durante os primeiros 120 min do TTG (2).
 1. $(\text{AUC } 5\text{--}120 \text{ min mg/dL glicose} \times 1 \text{ dL}/100 \text{ mL}) / (\text{AUC } 5\text{--}120 \mu\text{IU/mL ins})$
 - b. $\text{mg de captação de glicose} / \mu\text{IU de insulina circulante}$
 2. $(\text{Captação de Glicose}_{\text{GrupoA}} / \text{Captação de Glicose}_{\text{GrupoB}}) * 100$

Figura 4 – (A e B) Tubos de Centrifugação Tipo Falcon de 50 ml com amostras de líquido folicular após coleta por aspirações folicular guiada por ultrassonografia (OPU).

A

B

Fonte: Mingoti (2018).

Figura 5- (A e B) Amostras de sangue para análise metabólica e hormonal.

A

B

Fonte: Mingoti (2018).

Figura 6 – (A) População folicular avaliado previamente a OPU utilizando ultrassom Mindray Vet 2200 e (B) Maturação *in vitro* de oócitos

A

B

Fonte: Mingoti (2018).

5.12 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas utilizando o software *Statistical Analysis System* (SAS, Version 9.4 for Windows; SAS Inst., Cary, NC) através do pacote *Enterprise Guide* (v 7.1).

Todos os dados foram testados quanto a normalidade dos resíduos usando o procedimento *UNIVARIATE* de acordo com o teste de *Shapiro-Wilk*. Quando a normalidade não foi obtida, os dados foram transformados (*Log₁₀*; *Log natural*; *Raiz quadrada*; *Arco seno* ou *Box-Cox*). Outliers foram removidos quando necessário. O efeito foi determinado por ANOVA bi-direccional utilizando *somas de quadrados do Tipo III*.

Para dados contínuos a comparação das médias foi realizada por contrastes ortogonais utilizando regressão logística através do procedimento *Glimmix* especificando a distribuição *Gaussian*. Entretanto, para dados categóricos e cálculo de taxas (%) foram analisados pelo procedimento *GLIMMIX* ajustando para distribuição *Binomial* e função *link = Logit*.

No modelo, foram incluídos os efeitos de fase da lactação [C1; *terço inicial vs. terzo final da lactação (IL vs. FL-P & FL-RS)*] e *status reprodutivo* no terzo final da lactação [(C2; *prenhez vs. repetidora de serviço (FL-P vs. FL-RS)*)], onde C1= Contraste 1; C2= Contraste 2; IL= Terço inicial da lactação; FL-P = Terço final da lactação – Prenha e FL-RS = Terço final da lactação – Repetidora de serviço

Para correção dos graus de liberdade das variâncias foi incluída a opção, *ddfm = kenwardroger*. Os resíduos foram utilizados como efeito aleatório e *Animal(Categoria)* como *erro termo*. Especificamente para análises de *PIVE*, o número total de oócitos recuperados foi utilizado como *covariável* ao modelo. O teste *post hoc* de diferença significativa incluiu ajuste de *Tukey*. Os valores foram apresentados como *média±SEM*. Diferenças foram aceitas para valores de $P \leq 0,05$

Para medidas repetidas no tempo, o modelo incluiu efeito de *grupo* (IL, FL-RS, FL-P), *tempo* (min; -20; -10; 0; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 80; 100; 120) e *interações* especificando a distribuição *Poisson*. *Tempo* e *resíduos* foram inseridos como efeito aleatório. *Animal(categoria)* foi usado como *erro termo*. Além disso, especificou a opção, *ddfm = kenwardroger* para correção dos graus de liberdade das variâncias. A estrutura de covariância selecionada foi *não estruturada (UN)*, a qual forneceu o melhor ajuste para estas análises de acordo com o critério de informação de *Akaike*. O teste *post hoc* de

diferença significativa incluiu ajuste de *Tukey* para determinar diferenças entre grupo, tempo e interação grupo*tempo. Os valores foram apresentados como média $\pm$ SEM. Diferenças foram aceitas para valores de $P \leq 0,05$

6. RESULTADOS

Na Tabela 1 foram apresentados os resultados das características produtivas e reprodutivas referentes às vacas incluídas no estudo. Conforme as premissas impostas no delineamento experimental, vacas na fase final da lactação (C1; FL-RS & RS-P) apresentaram maior DEL ($P_{C1} < 0,0001$), ECC ($P_{C1} = 0,003$) e menor produção de leite (kg/dia; $P_{C1} = 0,0008$) quando comparadas a vacas no terço inicial da lactação (IL). No entanto, essas mesmas variáveis não apresentaram diferença quando avaliado o status reprodutivo entre vacas no terço final da lactação (C2; FL-RS vs. FL-P; $P_{C2} > 0,05$).

Os resultados dos parâmetros bioquímicos séricos (Tabela 2) demonstram que vacas no terço final da lactação apresentam maior concentrações séricas de colesterol [Total ($P_{C1} < 0,001$) e LDL ($P_{C1} < 0,001$)] e triglicérides ($P_{C1} = 0,001$) do que vacas no IL. De maneira interessante, FL-P apresentaram maior concentração circulante de triglicérides do que FL-RS ($P_{C2} = 0,02$).

Os resultados dos parâmetros bioquímicos avaliados no líquido folicular (Tabela 3) foram semelhante aos parâmetros bioquímicos séricos, destacando que vacas na fase da final de lactação apresentam maior concentrações séricas de colesterol [Total ($P_{C1} < 0,001$) e LDL ($P_{C1} = 0,001$)] e triglicérides ($P_{C1} = 0,05$) do que a categoria IL. Entretanto, não foi observado diferenças para nenhuma das variáveis quando avaliadas o status reprodutivo das vacas no terço final da lactação ($P_{C2} > 0,05$).

Os resultados da concentração plasmática de glicose em resposta ao TTG (Tabela 4) mostram que vacas no terço final de lactação, apresentaram maior concentração basal de glicose ($P_{C1} < 0,0004$) e maior pico glicêmico, entre 5 e 10 minutos, após a infusão ($P_{C1} = 0,04$). Entretanto, não foram encontradas diferenças entre fase da lactação (C1) e status reprodutivo (C2), sobre a taxa de depuração de glicose ($k; \% / \text{min}$; $P_{C1} = 0,37$; $P_{C2} = 0,54$), $T_{1/2}$ (min; $P_{C1} = 0,65$; $P_{C2} = 0,90$), variação máxima de glicose ($\Delta \text{máx.}$, mg/dL; $P_{C1} = 0,08$; $P_{C2} = 0,34$), AUC 5-60 ($P_{C1} = 0,14$; $P_{C2} = 0,77$) ou AUC 5-120 ($P_{C1} = 0,15$; $P_{C2} = 0,79$), indicando taxa semelhante para uso de glicose.

Na Figura 6, foi apresentado o perfil de glicose circulante em resposta TTG. Foi observado efeito de tempo ($P < 0,001$), destacando pico glicêmico, entre 0 e 10 min após o fim da infusão de glicose, demonstrando resposta ao desafio do TTG. No entanto, não foi observado interação tempo*categoria ($P = 0,58$) e diferenças entre as categorias ($P = 0,24$) para concentração de glicose circulante.

Os resultados da concentração plasmática de insulina em resposta ao TTG (Tabela 5) demonstram que vacas no terço final da lactação apresentaram maior liberação total de insulina entre 5-60min ($P_{C1} = 0,04$) e 5-120min ($P_{C1} = 0,02$) do que vacas no IL. Entretanto, essas diferenças não foram observadas entre as categorias FL-P e FL-RS [5-60min ($P_{C2} = 0,28$); 5-120min ($P_{C2} = 0,44$)]. Da mesma maneira, não foram encontradas diferenças entre fase da lactação (C1) e status reprodutivos (C2), para taxa de depuração de glicose ($k; \% / \text{min}$; $P_{C1} = 0,99$; $P_{C2} = 0,12$), $T_{1/2}$ (min; $P_{C1} = 0,67$; $P_{C2} = 0,26$) e variação máxima de glicose ($\Delta \text{máx.}$, mg/dL; $P_{C1} = 0,08$; $P_{C2} = 0,08$).

Na

Figura 7, foi apresentado o perfil de insulina circulante em resposta TTG. Foi observado efeito de tempo ($P < 0,001$), destacando acelerado incremento na concentração de insulina, com pico entre 0 e 10 min, evidenciando resposta ao desafio com glicose. Houve efeito de categoria em que vacas FL-RS apresentaram maior liberação de insulina nos tempos 5, 10, 30 40, 50, 60 e 80 min após a infusão de glicose ($P = 0,01$). Contudo, não foi observado interação entre tempo*categoria ($P = 0,31$).

Os resultados da *PIVE* (Tabela 7) demonstram que vacas no terço final da lactação apresentaram menor CFA ($P_{C1} = 0,03$), maior quantidade de blastocistos por OPU ($P_{C1} = 0,02$), maior taxa de blastocistos ($P_{C1} = 0,01$) e maior taxa de desenvolvimento embrionário ($P_{C1} = 0,03$) quando comparada a categoria IL. No entanto, não foi observado diferenças entre fase da lactação (C1) e status reprodutivos de vacas no final da lactação (C2) para número de oócitos recuperados OPU ($P_{C1} = 0,06$; $P_{C2} = 0,59$), Taxa de recuperação (%; $P_{C1} = 0,72$; $P_{C2} = 0,60$), número de oócitos viáveis ($P_{C1} = 0,69$; $P_{C2} = 0,75$), taxa de oócitos viáveis (%; $P_{C1} = 0,56$; $P_{C2} = 0,59$), clivados por OPU (n; $P_{C1} = 0,41$; $P_{C2} = 0,58$) e Taxa de Clivagem (%; $P_{C1} = 0,37$; $P_{C2} = 0,90$).

Tabela 1 - Características produtivas e reprodutivas em vacas Holandesas (*Bos taurus*) de vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016].

Item	Tratamentos			P value	
	Início Lactação IL (n=9)	Final da Lactação RS (n=10)	Final da Lactação Prenha (n=9)	C1 Fase Lact. Início vs. Final	C2 Status Repr. RS vs. Prenha
Paridade	2,7±0,5	2,0±0,47	2,1±0,4	0,08	0,53
Produção de leite, kg/dia	24,9±1,7	17,2±0,9	19,6±1,3	0,0008	0,18
DEL, dias	45±10	342±22	304±21	< 0,0001	0,18
ECC (1 a 5)	2,9±0,07	3,4±0,12	3,4±0,06	0,003	0,70

Vacas no terço final da lactação – Prenha (n=9)

DEL à concepção, dias	189±27	-	-
Tempo de gestação no momento da OPU, dias	115±11	-	-

Fonte: Mingoti (2018).

C1 = Contraste 1 = Fase da lactação [Início da Lactação vs. Final Lactação (RS & Prenha)]

C2 = Contraste 2 = Status reprodutivo no final da lactação (Repetidora de Serviço vs. Prenhez)

1 Os dados estão apresentados em Média ± EPM.

Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos séricos de vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016]

Item	Tratamentos			P value	
	Início Lactação (n=9)	Final da Lactação RS (n=10)	Final da Lactação Prenha (n=9)	C1 Fase Lact. Início vs. Final	C2 Status Repr. RS vs. Prenha
Ureia, mg/dL	20,6±0,9	18,6±0,6	20,0±1,3	0,39	0,23
Colesterol, mg/dL	76,2±6,0	110,5±5,1	105,9±7,6	<0,001	0,89
Triglicérides, mg/dL	7,8±0,7	9,3±0,9	11,5±1,2	0,001	0,02
NEFA, µmol/L	0,41±0,03	0,37±0,03	0,39±0,05	0,19	0,87
BHBA, µmol/L	0,16±0,03	0,17±0,02	0,18±0,02	0,42	0,62
HDL, mg/dL	55,2±4,1	60,9±2,9	65,4±5,1	0,06	0,51
LDL, mg/dL	6,8±0,5	11,4±0,6	11,1±0,5	<0,001	0,92

Fonte: Mingoti (2018).

C1 = Contraste 1 = Fase da lactação [Início da Lactação vs. Final Lactação (RS & Prenha)]

C2 = Contraste 2 = Status reprodutivo no final da lactação (Repetidora de Serviço vs. Prenhez)

¹ Os dados estão apresentados em Média ± EPM.

Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos avaliados no líquido folicular de vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016]

Item	Tratamentos			P value	
	Início Lactação (n=9)	Final da Lactação RS (n=10)	Final da Lactação Prenha (n=9)	C1 Fase Lact. Início vs. Final	C2 Status Repr. RS vs. Prenha
Ureia, mg/dL	28,7±1	24,1±2,9	27,5±1,4	0,24	0,96
Colesterol, mg/dL	40,4±3,8	53,0±3,8	58,7±3,2	< 0,001	0,65
Triglicérides, mg/dL	4,62±14,4	9,25±2,81	9,36±2,11	0,05	0,38
NEFA, µmol/L	0,22±0,02	0,22±0,02	0,23±0,02	0,52	0,45
BHBA, µmol/L	0,37±0,04	0,35±0,05	0,41±0,04	0,85	0,06
HDL, mg/dL	35,3±2,7	36,0±2,9	37,7±2,3	0,10	0,69
LDL, mg/dL	3,5±0,6	6,3±0,7	7,9±1,1	0,001	0,95

Fonte: Mingoti (2018).

C1 = Contraste 1 = Fase da lactação [Início da Lactação vs. Final Lactação (RS & Prenha)]

C2 = Contraste 2 = Status reprodutivo no final da lactação (Repetidora de Serviço vs. Prenhez)

¹ Os dados estão apresentados em Média ± EPM.

Tabela 4 – Concentração plasmática de glicose em resposta ao teste de tolerância à glicose (0,3 g / kg de PV de glicose *i.v.*) de vacas Holandesas no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016].

Item	Tratamentos			P value	
	Início Lactação (n=9)	Final da Lactação RS (n=10)	Final da Lactação Prenha (n=9)	C1 Fase Lact. Início vs. Final	C2 Status Repr. RS vs. Prenha
Glicose Basal, mg/dL	61,2±3,3	71,2±1,9	69,8±1,9	0,004	0,66
Pico de Glicose, mg/dL	205,8±12,9	259,1±21,2	289,9±31,4	0,04	0,37
k, % min	1,3±0,1	1,6±0,2	1,4±0,1	0,37	0,54
T _{1/2} , min	53,5±3,5	50,9±6,6	50±3,7	0,65	0,90
Δ máx., mg/dL ²	144,6±10,9	187,9±20,8	220,1±31,2	0,08	0,34
AUC 5–60, mg/dL × min	8368,8±708,3	9938,1±896,2	10289,9±909,1	0,14	0,77
AUC 5–120, mg/dL × min	13036,4±1138,9	15461,3±1338	15948,9±1416,1	0,15	0,79

Fonte: Mingoti (2018).

C1 = Contraste 1 = Fase da lactação [Início da Lactação vs. Final Lactação (RS & Prenha)]

C2 = Contraste 2 = Status reprodutivo no final da lactação (Repetidora de Serviço vs. Prenhez)

¹Os dados estão apresentados em Média ± EPM. ²Δmax = concentração máxima de insulina - concentração basal de insulina; k = taxa de depuração da insulina = $[(\ln \text{glicose } t_{10} - \ln \text{glicose } t_{40}) / (t_{40} - t_{10})] \times 100$; insulina t10 e insulina t40 foram respectivamente as concentrações de insulina 10 e 40 min após a infusão de glicose; T_{1/2} = tempo para atingir metade da concentração máxima de insulina $(0,693 / k) \times 100$; AUC 5–60 = AUC de glicose no intervalo de 5 a 60 minutos; AUC 5–120 = AUC de glicose no intervalo de 5 a 120 minutos.

Figura 6 - Perfil de glicose circulante (Média ± EPM) em resposta ao teste de tolerância à glicose intravenosa (GTT; 0,3 g / kg de PV de glicose *i.v.*) de vacas Holandesas no terço inicial da lactação (n=9; DEL < 50 dias) e no terço final da lactação [DEL > 300 dias - repetidora de serviço (n=10) ou prenhez (n=9)].

Fonte: Mingoti (2018).

Dentro de um tempo, as diferenças ($P \leq 0,05$) entre terço inicial e terço final da lactação são representadas com um asterisco (*).

Tabela 5 – Concentração plasmática de insulina em resposta ao teste de tolerância à glicose (0,3 g / kg de PV de glicose *i.v.*) de vacas Holandesas no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016].

Item	Tratamentos			P value	
	Início Lactação (n=9)	Final da Lactação RS (n=10)	Final da Lactação Prenha (n=9)	C1 Fase Lact. Início vs. Final	C2 Status Repr. RS vs. Prenha
Insulina, $\mu\text{UI/mL}$	16,2 $\pm$ 3,9	28,2 $\pm$ 6,4	30,9 $\pm$ 7,3	0,13	0,76
Pico de Insulina, $\mu\text{UI/mL}$	78,6 $\pm$ 17,7	200,7 $\pm$ 46,4	128,2 $\pm$ 18,4	0,06	0,11
k, % min	1,7 $\pm$ 0,5	2,2 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,3	0,99	0,12
T $_{1/2}$, min	90,1 $\pm$ 37,5	62,3 $\pm$ 20,8	274,4 $\pm$ 211,8	0,67	0,26
Δ máx., $\mu\text{UI/mL}$	62,4 $\pm$ 15,9	172,5 $\pm$ 43,3	97,3 $\pm$ 13,5	0,08	0,08
AUC 5–60, $\mu\text{UI/mL} \times \text{min}$	3018,8 $\pm$ 676,2	6614,2 $\pm$ 1266,7	5153,9 $\pm$ 698,2	0,04	0,28
AUC 5–120, $\mu\text{UI/mL} \times \text{min}$	4367,8 $\pm$ 927,1	9524,5 $\pm$ 1746,3	8047,6 $\pm$ 1113,8	0,02	0,44

Fonte: Mingoti (2018).

C1 = Contraste 1 = Fase da lactação [Início da Lactação vs. Final Lactação (RS & Prenha)]

C2 = Contraste 2 = Status reprodutivo no final da lactação (Repetidora de Serviço vs. Prenhez)

¹Os dados estão apresentados em Média $\pm$ EPM. 2 Δ max = concentração máxima de insulina - concentração basal de insulina; k = taxa de depuração da insulina = $[(\ln \text{ insulina } t_{10} - \ln \text{ insulina } t_{40}) / (t_{40} - t_{10})] \times 100$; insulina t_{10} e insulina t_{40} foram respectivamente as concentrações de insulina 10 e 40 min após a infusão de glicose; T $_{1/2}$ = tempo para atingir metade da concentração máxima de insulina $(0,693 / k) \times 100$; AUC 5–60 = AUC de insulina no intervalo de 5 a 60 minutos; AUC 5–120 = AUC de insulina no intervalo de 5 a 120 minutos.

Figura 7 – Perfil de insulina circulante (Média $\pm$ EPM) em resposta ao teste de tolerância à glicose intravenosa (GTT; 0,3 g / kg de PV de glicose *i.v.*) de vacas Holandesas no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação [DEL > 300 dias - repetidora de serviço (n=10) ou prenhez (n=9)].

Fonte: Mingoti (2018).

Dentro de um tempo, as diferenças ($P \leq 0,05$) entre terço inicial e terço final da lactação são representadas com um asterisco (*).

Tabela 6 – Secreção de insulina (A) e captação de glicose (B) em resposta ao teste de tolerância à glicose em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016]

A - Secreção de insulina - μIU Insulina / mg Glicose

Grupo	$(\Delta \text{máx Insulina, } \mu\text{IU} \times 100 \text{ mL/dL}) / (\Delta \text{máx Glicose mg/dL})$	Valor
IL	$(62,4 \times 100) / (144,6)$	43,15
FL-RS	$(172,5 \times 100) / (187,9)$	91,80
FL-P	$(97,3 \times 100) / (220,1)$	44,21
FL (RS & P)	$[(172,5+97,3) / 2 \times 100] / [(187,9+220,1) / 2]$	66,13
% de secreção de insulina por mg de aumento glicêmico		
FL (RS & P) / IL	66,13/43,15	153%
FL-RS / FL-P	91,80/44,21	208%

Fonte: Mingoti (2018)

Nota: IL - vacas no início da lactação (n=9); FL-RS – Vacas no terço final da lactação - repetidoras de serviço (n=10); FL-P – Vacas no terço final da lactação – prenhas (n=9); FL (RS & P) – Vacas no terço no final de lactação – Repetidoras de serviços e prenhas

B - Captação de glicose durante os primeiros 120 min do TTG

Grupo	$(\text{AUC } 5\text{--}120 \text{ min mg/dL glicose} \times 1 \text{ dL} / 100 \text{ mL}) / (\text{AUC } 5\text{--}120 \text{ mg/dL insulina})$	Valor
IL	$(13036,4/100) / (4367,8)$	0,0298
FL-RS	$(15461,3/100) / (9524,5)$	0,0162
FL-P	$(15948,9/100) / (8047,6)$	0,0198
FL (RS & P) / IL	$[(15461,3+15948,9) / 2 / 100] / [(9524,5+8047,6) / 2]$	0,0179
% de captação de glicose durante os primeiros 120 min do TTG		
FL (RS & P) / IL	0,0179/0,0298	59,89%
FL-RS / FL-P	0,0162/0,0198	81,91%

Fonte: Mingoti (2018)

Nota: IL - vacas no início da lactação (n=9); FL-RS – Vacas no terço final da lactação - repetidoras de serviço (n=10); FL-P – Vacas no terço final da lactação – prenhas (n=9); FL (RS & P) – Vacas no terço no final de lactação – Repetidoras de serviços e prenhas.

Tabela 7 –Produção *in vitro* de embriões em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016]

Item	Tratamentos			P value	
	Início Lactação (n=9)	Final da Lactação RS (n=10)	Final da Lactação Prenha (n=9)	C1 Fase Lact. Início vs. Final	C2 Status Repr. RS vs. Prenha
Folículos por OPU	21,3±6,0	13,6±4,3	10,8±2,2	0,03	0,53
Oócitos recuperados OPU	16,9±5,4	10,6±3,3	7,92±1,9	0,06	0,59
Taxa de recuperação, % ¹	78,3%	73,7%	75,2%	0,72	0,60
Oócitos viáveis	9,9±2,7	6,3±2,2	5,0±1,2	0,69	0,75
Taxa de Oócitos viáveis, % ²	54,0%	61,7%	55,5%	0,56	0,59
Clivados por OPU, n	4,9±1,8	2,9± 1,1	2,9± 0,9	0,41	0,58
Taxa de Clivagem, % ³	41,8%	44,8%	51,0%	0,37	0,90
Blastocistos por OPU	0,9±0,5	1,1±0,5	1,3±0,4	0,02	0,05
Taxa de blastocistos, % ⁴	10,0%	18,9%	22,8%	0,01	0,06
Taxa de Desenvolvimento Embrionário (%) ⁵	14,0%	41,3%	38,1%	0,03	0,17

Fonte: Mingoti (2018).

C1 = Contraste 1 = Fase da lactação [Início da Lactação vs. Final Lactação (RS & Prenha)]; C2 = Contraste 2 = Status reprodutivo no final da lactação (Repetidora de Serviço vs. Prenhez); ¹Taxa de recuperação = Total de oócitos recuperados / Total de Folículos puncionados; ²Taxa de Oócitos viáveis = Total de viáveis / Total de oócitos recuperados; ³Taxa de clivagem = Total de oócitos clivados / Total de oócitos recuperados; ⁴Taxa de Blastocistos = Total de blastocistos / Total de oócitos recuperados; ⁵Taxa de Desenvolvimento Embrionário = Blastocistos / Clivados; Dados estão apresentados em Média ± EPM. $P \leq 0,05$.

Experimento II

*Resistência periférica a insulina em
vacas Holandesas (Bos taurus)
repetidoras de serviço submetidas a
secagem*

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1.1 Aspectos éticos no uso de animais – Item 5.1, Página 44

7.2 Local, período de execução e origem animais

O projeto foi realizado entre os meses de fevereiro de 2016 e março de 2016, na fazenda Palmeiras do Instituto de Zootecnia (IZ-APTA), localizada no município de Nova Odessa - SP -Brasil

7.3 Animais e Instalações

Vinte e sete fêmeas bovinas da raça Holandesa (*Bos taurus*) foram utilizadas nesse experimento. Os animais permaneceram em sistema de estabulação livre do tipo “open lot” (baías de estabulação livre com acesso a piquetes para pastejo de capim braquiária - *Brachiária decumbens*) com acesso a água *ad libitum* (estabelecido na propriedade). A alimentação, era composta por silagem de milho e concentrado a base de soja e milho, suficientes para suprir ou sobrepor os requerimentos nutricionais de vacas leiteiras em lactação (NRC 2001). As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia.

7.4 Grupos Experimentais, Randomização e Unidade Experimental

O presente experimento foi delineado um ensaio inteiramente casualizados utilizando arranjo de três tratamentos experimentais. Os grupos e critérios de seleção adotados para criação dos grupos experimentais foram:

1. Vacas no terço inicial da lactação (IL; n=9)
 - Multíparas; DEL ≥ 90 dias (terço inicial da lactação); nenhum evento reprodutivo (IA=0) e ECC $> 2,75$
2. Vacas repetidoras de serviço (FL-RS; n=9)
 - Multíparas; DEL ≥ 300 dias (terço final da lactação); IA ≥ 3 e ECC $\geq 3,00$;
3. Vacas Secas (VS-RS; n=9)
 - Multíparas; Período seco ≥ 60 dias; IA ≥ 3 e ECC $\geq 3,00$.

7.5 Delineamento experimental

Figura 8 Delineamento experimental para aspiração folicular da *PIVE*, coleta de líquido folicular e TTG em vacas Holandesas (*Bos taurus*); *PIVE* = produção *in vitro* de embriões; FF – Coleta de líquido folicular; TTG – Teste de tolerância a glicose.

Fonte: Mingoti (2018).

7.6 Desenho Experimental

Figura 9 - Desenho Experimental – Resistência periférica a insulina em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação, no terço final da lactação (repetidora de serviço) e vacas repetidoras de serviço secas.

Fonte: Mingoti (2018).

7.7 Procedimentos Experimentais

7.7.1 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) – Item 5.7.1, Página 47

7.7.2 Coletas de sangue, líquido folicular, análise metabólica e hormonal – Item 5.8, Página 50

7.7.3 Teste de tolerância à glicose (TTG) – Item 5.10, Página 52

7.7.4 Sensibilidade a insulina – Item 5.11, Página 52

7.7.5 Protocolo de Secagem

Após a última ordenha, foi aplicada solução desinfetante nos tetos, que foram posteriormente secos com papel toalha, e feita à assepsia da ponta do teto com algodão e álcool 70%. Em seguida, foi introduzida delicadamente a ponta da bisnaga de Ciprolac® (Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil) em cada teto para a administração do fármaco, seguida de massagem do teto. Sequencialmente, foi introduzida delicadamente em cada teto, a ponta da bisnaga e aplicado Sellat® (Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil). Após a aplicação do Sellat®, não houve a massagem do teto. O protocolo de secagem abrangeu a vacinação para a prevenção de mastite via aplicação de 5 ml de Mastiplus-BR® (Vitafort Animal Defense) por via subcutânea no momento da secagem, com reforço vacinal 30 dias após a secagem.

7.8 . Receptoras e Protocolo de TETF

Todos os embriões vitrificados, foram transferidos em receptoras nelores (*Bos indicus*), na fazenda do estado localizada na cidade de Andradina-SP. Os embriões foram desvitrificados pela equipe da WTA-FIVE e transferidos no mesmo dia pelo Médico Veterinário Bernardo Marcozzzi (Bovigênese – Cravinhos/SP).

No início do protocolo (D0) todas as receptoras foram avaliadas quanto a ECC e categoria. A avaliação ginecológica das receptoras foi realizada através de palpação transretal com uso de ultrassom, onde se avaliou o grau de tortuosidade da cérvix, espessura, simetria e contratilidade dos cornos uterinos além do tamanho, presença e/ou ausência de estruturas, como folículos e corpo lúteo, nos ovários. Após a avaliação da receptora foi efetuado a inserção de um dispositivo intravaginal de 1g de progesterona (P4; Sincrogest®, Ourofino, Brasil) e na aplicação intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Sincrodiol®, Ourofino, Brasil). No D8 foi efetuado a remoção do dispositivo de P4 foi e aplicado por 300 IU de gonadotrofina coriônica equina (*i.m.*; eCG; Novormon®, Zoetis, Brasil), 0.530mg de cloprostenol sódico (PGF-2 α ; Sincrocio®, Ourofino, Brasil) e de 1 mg de cipionato de estradiol (CE; SincroCP®, Ourofino, Brasil).

Previamente a transferência de embriões, todas as receptoras foram novamente avaliadas com auxílio de ultrassom color doppler (Sonoscape, modelo S8) conforme a presença, tamanho e vascularização do corpo lúteo. Apenas animais que possuíam corpo lúteo acima de 20mm e 85% de vascularização foram selecionados. A transferência de embriões em tempo fixo foi realizada no dia 17.

7.8.1 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 30 dias após a TE por ultrassonografia transretal (Vet-2200, Mindray, DPS). A prenhez foi caracterizada pela presença de uma vesícula embrionária com um embrião viável (presença de batimentos cardíacos). A taxa de concepção foi calculada com base na proporção de vacas prenhes no diagnóstico de gestação com relação ao número de fêmeas que receberam um embrião.

7.9 Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas utilizando o software *Statistical Analysis System* (SAS, *Version 9.4 for Windows*; SAS Inst., Cary, NC) através do pacote *Enterprise Guide* (v 7.1).

Todos os dados foram testados quanto a normalidade dos resíduos usando o procedimento *UNIVARIATE* de acordo com o teste de *Shapiro-Wilk*. Quando a normalidade não foi obtida, os dados foram transformados (*Log₁₀*; *Log natural*; *Raiz quadrada*; *Arco seno* ou *Box-Cox*). Outliers foram removidos quando necessário. O efeito foi determinado por ANOVA bi-direccional utilizando *somas de quadrados do Tipo III*.

Para dados contínuos a comparação das médias foi realizada por contrastes ortogonais utilizando regressão logística através do procedimento *Glimmix* especificando a distribuição *Gaussian*. Entretanto, para dados categóricos e cálculo de taxas (%) foram analisados pelo procedimento *GLIMMIX* ajustando para distribuição *Binomial* e função *link = Logit*.

No modelo, foram incluídos os efeitos de *Fase da lactação* [(C1; *terço inicial* vs. *terço final da lactação* (IL vs. FL-RS))] e *Status fisiológico* [C2; *Lactação* vs. *Vaca seca* (IL & FL-RS vs. VS-RS)], onde C1= Contraste 1; C2= Contraste 2; IL= Terço inicial da lactação; FL-RS = Terço final da lactação – Repetidora de serviço e VS-RS = Vaca seca - Repetidora de serviço.

Para correção dos graus de liberdade das variâncias foi incluída a opção, *ddfm = kenwardroger*. Os resíduos foram utilizados como efeito aleatório e *Animal(Categoria)* como *erro termo*. Especificamente para análises de *PIVE*, o número total de oócitos recuperados foi utilizado como *covariável* ao modelo. O teste *post hoc* de diferença significativa incluiu ajuste de *Tukey*. Os valores foram apresentados como *média±SEM*. Diferenças foram aceitas para valores de $P \leq 0,05$

Para medidas repetidas no tempo, o modelo incluiu efeito de *grupo* (IL, FL-RS, VS-RS), *tempo* (min; -20; -10; 0; 5; 10; 20; 30; 40; 60; 80; 100; 120) e *interações* especificando a distribuição *Poisson*. *Tempo* e *resíduos* foram inseridos como efeito aleatório. *Animal dentro da categoria* foi usado como *erro termo*. Além disso, especificou a opção, *ddfm = kenwardroger* para correção dos graus de liberdade das variâncias. A estrutura de covariância selecionada foi *não estruturada (UN)*, a qual forneceu o melhor ajuste para estas análises de acordo com o critério de informação de *Akaike*. O teste *post*

hoc de diferença significativa incluiu ajuste de *Tukey* para determinar diferenças entre grupo, tempo e interação grupo*tempo. Os valores foram apresentados como média $\pm$ SEM. Diferenças foram aceitas para valores de $P \leq 0,05$.

8. RESULTADOS

Conforme as premissas impostas no delineamento experimental, os resultados apresentados na Tabela 8, demonstram que vacas FL-RS apresentaram maior DEL ($P_{C1} < 0,001$) e menor produção de leite (kg/dia; $P_{C1} = 0,006$) quando comparadas a vacas no IL. Em destaque, observa-se o significativo incremento do ECC em vacas FL-RS ($P_{C1} = 0,01$) e em VS-RS ($P_{C2} = 0,05$).

Os resultados dos parâmetros bioquímicos séricos (Tabela 9) demonstram que FL-RS apresentam maiores concentrações séricas de triglicérides ($P_{C1} = 0,001$) e colesterol ($P_{C1} < 0,001$) e menor concentração de HDL ($P_{C1} = 0,001$) do que vacas no IL. Entretanto, o procedimento de secagem causa significativo aumento das concentrações basais de Triglicérides ($P_{C2} < 0,0001$) e LDL ($P_{C2} = 0,006$), e contrariamente, queda nas concentrações de Ureia ($P_{C2} < 0,001$), HDL ($P_{C2} < 0,001$) e BHBA ($P_{C2} = 0,004$).

Os resultados dos parâmetros bioquímicos avaliados no líquido folicular (Tabela 10) demonstram que FL-RS apresentam maior concentração sérica de colesterol ($P_{C1} = 0,04$) e menores concentrações séricas de Ureia ($P_{C1} = 0,005$), NEFA ($P_{C1} = 0,02$) e HDL ($P_{C1} = 0,01$) do que vacas IL. Durante o período seco observa-se significativo aumento de colesterol ($P_{C2} = 0,05$) e LDL ($P_{C2} < 0,001$) e queda de Ureia ($P_{C2} < 0,001$), HDL ($P_{C2} < 0,001$) e BHBA ($P_{C2} < 0,001$). Apesar de observado aumento sanguíneo de Triglicérides no líquido folicular permanece constante com a evolução da lactação e mesmo após a secagem ($P_{C1} = 0,85$; $P_{C2} = 0,92$).

Os resultados da concentração plasmática de glicose em resposta ao TTG (Tabela 11) demonstram que vacas FL-RS demonstraram maior concentração basal de glicose ($P_{C1} < 0,05$), maior pico glicêmico ($P_{C1} = 0,008$), maior variação máxima de glicose ($\Delta \text{máx.}$, mg/dL; $P_{C1} = 0,04$) e menor $T_{1/2}$ (min; $P_{C1} = 0,05$) que vacas no IL. O processo de secagem em vacas RS não demonstrou efeito sobre concentração basal de glicose ($P_{C2} = 0,56$), no entanto, intensificou o pico glicêmico ($P_{C2} < 0,0001$), taxa de depuração de glicose (k;% / min; $P_{C2} = 0,0002$), variação máxima de glicose ($\Delta \text{máx.}$, mg/dL; $P_{C2} < 0,0001$) e deprimiu o $T_{1/2}$ (min; $P_{C2} = 0,05$) que vacas no FL-RS.

Na , foi apresentado o perfil de glicose circulante em resposta TTG. Foi observado interação tempo*categoria ($P = 0,001$) demonstrando, que o período entre 5 e 10 min após o fim da infusão de glicose, exibiu maior pico glicêmico em VS-RS do que vacas em lactação ($P_{C2} = 0,02$). Não houve diferenças entre fase da lactação ($P_{C1} = 0,89$).

Resultados da concentração plasmática de insulina em resposta ao TTG (Tabela 12) demonstram não haver diferenças para nenhuma das variáveis analisadas quando analisados os animais em lactação ($P_{C1} > 0,05$). Entretanto, quando observado o status fisiológico, o grupo VS-RS apresentou maior pico insulinêmico ($P_{C2} = 0,0004$), variação máxima de insulina ($\Delta \text{máx.}$, mg/dL; $P_{C2} = 0,0003$), AUC 5-60min ($P_{C2} = 0,0007$) e AUC 5-120min ($P_{C2} = 0,002$) do que vacas em lactação.

Na Figura 11, foi apresentado o perfil de insulina circulante em resposta TTG. Foi observado interação tempo*categoria ($P = 0,01$) demonstrando, que o período entre 5 e 40 min após o fim da infusão de glicose, exibiu maior pico glicêmico para VS-RS que em vacas em lactação ($P_{C2} = 0,04$). Não houve diferenças entre fase da lactação ($P_{C1} = 0,66$).

Os resultados da produção *in vitro* de embriões não demonstram diferença entre fase de lactação ($C1$) para nenhuma das variáveis analisadas ($P_{C1} > 0,05$). Entretanto, quando observado o status fisiológico, verificou-se que o grupo VS-RS apresentou maior quantidade de blastocistos por OPU ($P_{C2} = 0,02$), maior taxa de blastocistos ($P_{C2} = 0,002$) e maior taxa de desenvolvimento embrionário ($P_{C2} = 0,01$) quando comparada a vacas lactantes. No entanto, apesar dos resultados observadas na *PIVE*, não foi observado diferenças na taxa de prenhez (

Figura 12) entre fase da lactação ($P_{C1} = 0,44$) e status fisiológico ($P_{C2} = 0,76$;

Figura 12).

Tabela 8 - Características produtivas e reprodutivas em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial (DEL < 100 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 100 dias) [março e julho de 2016].

Item	Tratamentos			P value	
	Início Lactação IL (n=9)	Final da Lactação RS (n=8)	Vaca Seca (n=9)	C1 Fase Lact. Início vs. Final	C2 Status Lact vs. Seca
Paridade	2,67±0,29	2,63±0,38	2,41±0,17	0,91	0,42
ECC (1 a 5)	2,86±0,11	3,10±0,06	3,25±0,07	0,01	0,05
Grupo de vacas em lactação					
Produção de leite, kg/dia	27,9±2,01	19,4±1,66	-	0,006	-
DEL, dias	85,4±10,4	381±18,8	-	< 0,001	-
Grupo de vacas secas					
Período seco, dias	-	-	140±33	-	-

Fonte: Mingoti (2018)

C1 = Contraste 1 = Fase da lactação [Início da Lactação vs. Final Lactação (RS)]

C2 = Contraste 2 = Status Fisiológico [Lactação (IL & RS) vs. Seca (RS)]

¹Os dados estão apresentados em Média ± EPM.

Tabela 9 – Parâmetros bioquímicos séricos em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial (DEL < 100 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 100 dias) [março e julho de 2016].

Item	Tratamentos			P value	
	Início Lactação IL (n=9)	Final da Lactação FL-RS (n=8)	Vaca Seca VS-RS (n=9)	C1 Fase Lact. Início vs. Final	C2 Status Lact vs. Seca
Ureia, mg/dL	24,4±1,8	27,5±4,0	20,9±1,0	0,06	0,005
Colesterol, mg/dL	95,0±4,2	141,4±10,8	139,6±9,4	<0,001	0,85
Triglicérides, mg/dL	9,7±0,5	16,9±2,3	28,1±2,1	0,0005	<0,001
NEFA, µmol/L	0,53±0,08	0,44±0,04	0,43±0,03	0,17	0,11
BHBA, µmol/L	0,33±0,03	0,32±0,02	0,24±0,03	0,53	0,004
HDL, mg/dL	91,2±3,7	77,6±7,0	56,6±2,9	0,03	<0,001
LDL, mg/dL	12,0±1,1	13,1±1,2	18,8±0,7	0,26	0,006

Fonte: Mingoti (2018).

C1 = Contraste 1 = Fase da lactação [Início da Lactação vs. Final Lactação (RS)]

C2 = Contraste 2 = Status Fisiológico [Lactação (IL & RS) vs. Seca (RS)]

¹Os dados estão apresentados em Média ± EPM.

Tabela 10 – Parâmetros bioquímicos avaliados no líquido folicular em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial (DEL < 100 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 100 dias) [março e julho de 2016].

Item	Tratamentos			P value	
	Início Lactação IL (n=9)	Final da Lactação FL-RS (n=8)	Vaca Seca VS-RS (n=9)	C1 Fase Lact. Início vs. Final	C2 Status Lact vs. Seca
Ureia, mg/dL	35,0±2,9	28,0±3,4	13,5±0,7	0,005	<0,001
Colesterol, mg/dL	53,0±1,8	61,5±4,3	67,7±3,7	0,04	0,05
Triglicérides, mg/dL	8,0±1,0	8,2±1,5	10,0±2,0	0,85	0,06
NEFA, µmol/L	0,25±0,01	0,22±0,02	0,21±0,01	0,02	0,04
BHBA, µmol/L	0,48±0,05	0,43±0,02	0,29±0,01	0,15	<0,001
HDL, mg/dL	42,8±1,9	33,8±2,4	23,6±1,0	0,01	<0,001
LDL, mg/dL	10,2±1,3	8,9±2,1	12,3±0,2	0,30	<0,001

Fonte: Mingoti (2018).

C1 = Contraste 1 = Fase da lactação [Início da Lactação vs. Final Lactação (RS)]

C2 = Contraste 2 = Status Fisiológico [Lactação (IL & RS) vs. Seca (RS)]

¹Os dados estão apresentados em Média ± EPM.

Tabela 11 – Concentração plasmática de glicose em resposta ao teste de tolerância à glicose (0,3 g / kg de PV de glicose *i.v.*) em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial (DEL < 100 dias), no terço final da lactação (DEL>300 d - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco>100 dias) [março e julho de 2016].

Item	Tratamentos			P value	
	Início Lactação IL (n=9)	Final da Lactação FL-RS (n=8)	Vaca Seca VS-RS (n=9)	C1 Fase Lact. Início vs. Final	C2 Status Fisiol. Lact vs. Seca
Glicose Basal, mg/dL	67,3±1,9	72,9±2,2	71,7±1,4	0,05	0,56
Pico de Glicose, mg/dL	265,6±8,2	297,8±6,8	348,8±10,6	0,008	< 0,0001
k, % min	1,3±0,1	1,7±0,2	2,5±0,3	0,10	0,0002
T½, min	56,1±4,3	44,4±4,3	29,7±3,7	0,05	0,002
Δ máx., mg/dL	198,3±8,4	224,9±8,4	277±10,2	0,04	< 0,0001
AUC 5–60, mg/dL × min	11018,4±290	11015,1±354,3	11338,7±745,9	0,90	0,58
AUC 5–120, mg/dL × min	16506,3±630,1	17165,7±755,7	16474,9±1223,4	0,54	0,72

Fonte: Mingoti (2018).

C1 = Contraste 1 = Fase da lactação [Início da Lactação vs. Final Lactação (RS)]

C2 = Contraste 2 = Status Fisiológico [Lactação (IL & RS) vs. Seca (RS)]

¹Os dados estão apresentados em Média ± EPM. 2 Δmax = concentração máxima de glicose - concentração basal de glicose; k = taxa de depuração da glicose = $[(\ln \text{glicose } t_{10} - \ln \text{glicose } t_{40}) / t_{40} - t_{10}] \times 100$; glicose t10 e glicose t40 foram respectivamente as concentrações de glicose 10 e 40 min após a infusão de glicose; T½ = tempo para atingir metade da concentração máxima de glicose $(0,693 / k) \times 100$; AUC 5–60 = AUC de glicose no intervalo de 5 a 60 minutos; AUC 5–120 = AUC de glicose no intervalo de 5 a 120 minutos.

Figura 10 - Perfil de glicose circulante (Média ± EPM) em resposta ao teste de tolerância à glicose intravenosa (GTT; 0,3 g / kg de PV de glicose *i.v.*) em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial (n=9; DEL < 100 dias), no terço final da lactação (n=8; DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (n=9; período seco > 100 dias).

Fonte: Mingoti (2018).

Dentro de um mesmo tempo, as diferenças entre status fisiológico (C2; IL & FL-RS vs. VS-RS) são indicadas por um asterisco (*).

Tabela 12 – Concentração plasmática de insulina em resposta ao teste de tolerância à glicose (0,3 g / kg de PV de glicose *i.v.*) em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial (DEL < 100 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 100 dias) [março e julho de 2016].

Item	Tratamentos			P value	
	Início Lactação IL (n=9)	Final Lactação FL-RS (n=8)	Vaca Seca VS-RS (n=9)	C1 Fase Lact. Início vs. Final	C2 Status Fisiol. Lact vs. Seca
Insulina, $\mu\text{UI/mL}$	19,0 $\pm$ 3,7	17,6 $\pm$ 2,4	18,0 $\pm$ 2,9	0,74	0,94
Pico de Insulina, $\mu\text{UI/mL}$	70,3 $\pm$ 10,9	72,7 $\pm$ 17,7	241,1 $\pm$ 58,1	0,96	0,0004
k, % min	1,1 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,9	2,6 $\pm$ 0,5	0,17	0,27
T $\frac{1}{2}$, min	94,8 $\pm$ 59,4	15,3 $\pm$ 28,6	43,9 $\pm$ 17,7	0,19	0,84
Δ máx., $\mu\text{UI/mL}$	51,2 $\pm$ 9,3	55,1 $\pm$ 16,6	219,6 $\pm$ 56,5	0,93	0,0003
AUC 5–60, $\mu\text{UI/mL} \times \text{min}$	2959,8 $\pm$ 458,9	2824,4 $\pm$ 505,4	7094,2 $\pm$ 1429,7	0,91	0,0007
AUC 5–120, $\mu\text{UI/mL} \times \text{min}$	4719,8 $\pm$ 595,1	4277,2 $\pm$ 631,8	8871,0 $\pm$ 1594,7	0,74	0,002

Fonte: Mingoti (2018).

C1 = Contraste 1 = Fase da lactação [Início da Lactação vs. Final Lactação (RS)]

C2 = Contraste 2 = Status Fisiológico [Lactação (IL & RS) vs. Seca (RS)]

¹Os dados estão apresentados em Média $\pm$ EPM. 2 Δ max = concentração máxima de insulina - concentração basal de insulina; k = taxa de depuração da insulina = $[(\ln \text{insulina } t_{10} - \ln \text{insulina } t_{40}) / (t_{40} - t_{10})] \times 100$; insulina t_{10} e insulina t_{40} foram respectivamente as concentrações de insulina 10 e 40 min após a infusão de glicose; T $\frac{1}{2}$ = tempo para atingir metade da concentração máxima de insulina $(0,693 / k) \times 100$; AUC 5–60 = AUC de insulina no intervalo de 5 a 60 minutos; AUC 5–120 = AUC de insulina no intervalo de 5 a 120 minutos.

Figura 11 – Perfil de insulina circulante (Média $\pm$ EPM) em resposta ao teste de tolerância à glicose intravenosa (GTT; 0,3 g / kg de PV de glicose *i.v.*) em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial (n=9; DEL < 100 dias), no terço final da lactação (n=8; DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (n=9; período seco > 100 dias).

Fonte: Mingoti (2018).

Dentro de um mesmo tempo, as diferenças entre status fisiológico (C2; IL & FL-RS vs. VS-RS) são indicadas por um asterisco (*).

Tabela 13 – Secreção de insulina (A) e captação de glicose (B) em resposta ao TTG em vacas Holandesas (*Bos taurus*)**A - Secreção de insulina - μ IU Insulina / mg Glicose**

Grupo	$(\Delta \text{ máx. Insulina, } \mu\text{IU} \times 100 \text{ mL/dL}) / (\Delta \text{ máx. Glicose mg/dL})$	Valor
IL	$(51,2 \times 100) / (198,3)$	25.82
FL-RS	$(55,1 \times 100) / (224,9)$	24.50
VS-RS	$(219,6 \times 100) / (277,0)$	79.28
LACT (IL & FL-RS)	$[(51,2+55,1) / 2] * 100 / [(198,3+224,9) / 2]$	25.12
% de secreção de insulina por mg de aumento glicêmico		
FL-RS / IL	24,50/25,82	95%
VS-RS / LACT (IL & FL-RS)	79,28/25,12	316%

Fonte: Mingoti (2018)

IL – vacas no terço inicial da lactação

FL-RS – Vacas no terço final da lactação - repetidoras de serviço

VS-RS – Vacas secas - repetidoras de serviço

LACT (IL & FL-RS) – Vacas em lactação – Início de lactação e repetidoras de serviços

B - Captação de glicose durante os primeiros 120 min do TTG

Grupo	$(\text{AUC } 5-120 \text{ min mg/dL glicose} \times 1 \text{ dL}/100 \text{ mL}) / (\text{AUC } 5-120 \text{ mg/dL ins})$	Valor
IL	$(16056,3/100) / (4719,8)$	0,0340
FL-RS	$(17165,7/100) / (4277,2)$	0,0401
VS-RS	$(16474,9/100) / (8871,0)$	0,0186
LACT (IL & FL-RS)	$[(16056,3+17165,7) / 2] / 100 / [(4719,8+4277,2) / 2]$	0,0369
% de captação de glicose durante os primeiros 60 min do TT G		
FL-RS / IL	0,0401/0,0340	118%
VS-RS / LACT (IL & FL-RS)	0,0186/0,0369	50%

Fonte: Mingoti (2018).

IL – vacas no terço inicial da lactação

FL-RS – Vacas no terço final da lactação - repetidoras de serviço

VS-RS – Vacas secas - repetidoras de serviço

LACT (IL & FL-RS) – Vacas em lactação – Início de lactação e repetidoras de serviços

Tabela 14 –Produção *in vitro* de embriões em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhez) [Nova Odessa – SP / fevereiro, 2016]

Item	Tratamentos			P value	
	Início Lactação IL (n=9)	Final Lactação FL-RS (n=8)	Vaca Seca VS-RS (n=9)	C1 Fase Lact. Início vs. Final	C2 Status Fisiol. Lact vs. Seca
Folículos por OPU	14,4±2,5	19,8±4,5	18,9±2,3	0,48	0,49
Oócitos recuperados por OPU	10,9±1,9	14,8±3,5	14,6±1,9	0,55	0,46
Taxa de recuperação, % ¹	75,4%	74,7%	77,6%	0,91	0,60
Oócitos viáveis	6,7±1,4	9,1±2,5	8,4±1,0	0,82	0,94
Taxa de Oócitos viáveis, % ²	61,0%	61,6%	57,7%	0,93	0,53
Clivados por OPU, n	4,1±1,1	7,9±2,6	6,9±0,9	0,14	0,28
Taxa de Clivagem, % ³	37,1%	52,4%	47,4%	0,09	0,64
Blastocistos por OPU	2,1±0,9	3,3±1,0	4,5±0,7	0,73	0,02
Taxa de blastocistos, % ⁴	19,4%	22,0%	30,5%	0,63	0,002
Taxa de Desenvolvimento Embrionário (%) ⁵	51,5%	38,5%	63,6%	0,24	0,01

Fonte: Mingoti (2018).

C1 = Contraste 1 = Fase da lactação [Início da Lactação vs. Final Lactação (RS)]

C2 = Contraste 2 = Status Fisiológico [Lactação (IL & RS) vs. Seca (RS)]

¹Taxa de recuperação = Total de oócitos recuperados / Total de Folículos puncionados; ²Taxa de Oócitos viáveis = Total de viáveis / Total de oócitos recuperados; ³Taxa de clivagem = Total de oócitos clivados / Total oócitos recuperados; ⁴Taxa Blastocistos = Total de blastocistos / Total de oócitos recuperados; ⁵Taxa de Desenvolvimento Embrionário = Blastocistos / Clivados; ⁶Os dados estão apresentados em Média ± EPM. $P \leq 0,05$

Figura 12 – Taxa de prenhez de embriões vitrificados de vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação (DEL < 50 dias) e no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço ou prenhe) após transferências de embriões em tempo fixo em receptoras Nelore (*Bos indicus*) [Andradina – SP / Janeiro, 2018]

Fonte: Mingoti (2018).

Experimento III

*Resistência periférica a insulina
em vacas Holandesas (Bos taurus)
repetidoras de serviço secas
submetidas a indução de lactação*

9. MATERIAL E MÉTODOS

9.1.1 Aspectos éticos no uso de animais – Item 7.1.1, Página 66

9.2 Local, período de execução e origem dos animais

O projeto foi realizado entre os meses de agosto de 2016 e dezembro de 2016, na fazenda Palmeiras do Instituto de Zootecnia (IZ-APTA), localizada no município de Nova Odessa - SP -Brasil

9.2.1 Animais e Instalações – Item 7.3, Página 66

9.3 Grupos Experimentais, Randomização e Unidade Experimental

O presente experimento foi delineado um ensaio inteiramente casualizados utilizando arranjo com quatro tratamentos experimentais. Os grupos e critérios de seleção adotados para criação dos grupos experimentais foram:

1. Vacas no terço inicial da lactação (ILI; n=9) – Lactação Fisiológica
 - Multíparas; $DEL \leq 90$ dias (terço inicial da lactação); nenhum evento reprodutivo ($IA=0$) e $ECC > 2,75$.
2. Vacas no terço inicial da lactação (ILF; n=9) – RS submetidas a indução de lactação
 - Multíparas; $DEL \leq 90$ dias (terço inicial da lactação); nenhum evento reprodutivo ($IA=0$) e $ECC > 2,75$.
3. Vacas terço final da lactação - repetidoras de serviço (FL-RS; n=9)
 - Multíparas; $DEL \geq 300$ dias (terço final da lactação) e $IA \geq 3$, $ECC \geq 3,00$;
4. Vacas Secas repetidoras de serviço (VS-RS; n=8)
 - Multíparas; Período seco ≥ 60 dias; $IA \geq 3$ e $ECC \geq 3,00$.

9.4 Delineamento experimental

Figura 13 - Desenho Experimental - Efeito da secagem resistência periférica a insulina e produção *in vitro* de embriões de vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação, no terço final da lactação, secas e após a indução de lactação; FF – Coleta de líquido folicular; TTG – Teste de tolerância a glicose.

Fonte: Mingoti (2018).

9.5 Desenho experimental

Figura 14 - Esquema Experimental - Efeito da secagem resistência periférica a insulina e produção *in vitro* de embriões de vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação, no terço final da lactação, secas e após a indução de lactação.

Fonte: Mingoti (2018).

9.6 Procedimentos Experimentais

9.6.1 Protocolo de Secagem – Item 7.7.5, Página 68

9.6.2 Aspirações folicular guiada por ultrassonografia (OPU) – Item 5.7.1, Página 47

9.6.3 Coletas de sangue, líquido folicular, análise metabólica e hormonal – Item 5.8, Página 50

9.6.4 Teste de tolerância à glicose (TTG) – Item 5.10, Página 52

9.6.5 Sensibilidade a insulina – Item 5.11, Página 52

9.6.6 Receptoras e protocolo de TETF – Item 7.8, Página 68

9.6.7 Diagnóstico de gestação – Item 7.8.1, Página 69

9.6.8 Protocolo de indução de lactação

Para a indução da lactação utilizou-se o protocolo sugerido no estudo **Dose-effect relationship of Dexamethasone (20mg/d vs. 40mg/d vs. 80mg/d) on lactation induction protocol in Holstein cows** publicado no **18th International Conference on Animal Reproduction (ICAR)** ocorrido de 26 a 30 de junho de 2016 em Tour/França.

O protocolo consistiu em uma série de procedimentos e aplicações hormonais especificados na sequência. Diariamente, do 1º ao 8º dia foi aplicado benzoato de estradiol na dosagem de 30 mg/vaca/dia e do 9º ao 15º dia a dose foi reduzida para 20 mg/vaca/dia. Concomitante às primeiras aplicações de benzoato de estradiol (primeiro ao 8º dia) foi aplicada progesterona injetável (Sincrogest Injetável®, 300 mg/vaca/dia) e bSTr (500mg/vaca) foi administrado nos dias 1, 8, 15 e 21. No dia 16 foi administrada prostaglandina-F2 α (0,530 mg) e, dos dias 19 ao 21 foi administrada dexametasona em na dose de 40 mg/vaca/dia. Todas as vacas tiveram os tetos e úbere massageados diariamente durante 5 minutos, do 17º dia ao 21º dia. As ordenhas foram realizadas a partir do 21º dia do início do protocolo de indução de lactação. Após o início da lactação, todas as vacas continuaram a receber bSTr (500 mg/vaca) a cada 14 dias.

Figura 15 – Desenho esquemático do Protocolo de indução de lactação

Fonte: Mingoti (2018).

Nota: D0, D8, D15 e D21 = bSTr 500 mg; diariamente, do D0 ao D8 = P4 injetável 300 mg (2 mL Sincrogest® Injetável); diariamente, do D0 ao D8 = Benzoato de estradiol 30 mg (30 mL Sincrodiol); diariamente, do D9 ao D15 = Benzoato de estradiol 20 mg (20 mL Sincrodiol); D16 = Cloprostenol 0,530 mg (2 mL Sincrocio); D17 ao D21 = massagem dos tetos; Diariamente, do D19 ao D21 = Dexametasona 40 mg (20 mL Cortiflan®).

Figura 16 – (A) Material utilizado para teste de tolerância a glicose; (B) Produtos utilizados para o procedimento de secagem de vacas em lactação.

Fonte: Mingoti (2018).

Figura 17 – Instalações e animais durante o teste de tolerância a glicose.

Fonte: Mingoti (2018).

Figura 18 – (A) Grupo de Vacas no terço inicial da lactação; (B) Grupo de vacas secas submetidas a indução de lactação; (C) grupo de vacas secas

A

B

C

Fonte: Mingoti (2018).

Figura 19 – (A, B e C) Desenvolvimento da glândula mamária durante o protocolo hormonal de indução de lactação. (D) produção de leite após ordenha 45 dias após a indução de lactação.

Fonte: Mingoti (2018).

Figura 20 – (A e B) Grupo de vacas submetidas ao protocolo hormonal de indução de lactação após o fornecimento de dieta completa em instalações do tipo “open lote”.

Fonte: Mingoti (2018).

9.7 Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas utilizando o software *Statistical Analysis System* (SAS, Version 9.4 for Windows; SAS Inst., Cary, NC) através do pacote *Enterprise Guide* (v 7.1).

Todos os dados foram testados quanto a normalidade dos resíduos usando o procedimento *UNIVARIATE* de acordo com o teste de *Shapiro-Wilk*. Quando a normalidade não foi obtida, os dados foram transformados (*Log₁₀*; *Log natural*; *Raiz quadrada*; *Arco seno* ou *Box-Cox*). Outliers foram removidos quando necessário. O efeito foi determinado por ANOVA bi-direccional utilizando *somas de quadrados do Tipo III*.

Para dados contínuos a comparação das médias foi realizada através da regressão logística utilizando o procedimento *Glimmix* especificando a distribuição *Gaussian*. Entretanto, para dados categóricos e cálculo de taxas (%) foram analisados pelo procedimento *GLIMMIX* ajustando para distribuição *Binomial* e função *link = Logit*.

No modelo, foram incluídos os efeitos de *categoria* (ILI; ILF; FL-RS e VS-RS), *momento* (M1, M2 e M3) e *interação categoria*momento*.

Obs.: onde: [ILI = terço inicial da lactação após protocolo hormonal de indução de lactação (n=9); ILF = terço inicial da lactação após parto fisiológico (n=9); FL-RS = Terço final da lactação – Repetidoras de serviço (n=8) e VS-RS = Vaca seca repetidora de serviço (n=9)] e [M1=momento 1 = 03/10/2016, M2=momento 2 = 08/11/2016 e M3=momento 3 = 06/12/2016].

Para correção dos graus de liberdade das variâncias foi incluída a opção, *ddfm = kenwardroger*. Os resíduos foram utilizados como efeito aleatório e *Animal(Categoria)* como *erro termo*. Especificamente para análises de *PIVE*, o número total de oócitos recuperados foi utilizado como *covariável* ao modelo. O teste *post hoc* de diferença significativa incluiu ajuste de *Tukey*. Os valores foram apresentados como *média±SEM*. Diferenças foram aceitas para valores de $P \leq 0,05$

Para medidas repetidas no tempo, o modelo incluiu efeito de *grupo* (IL, FL-RS, FL-P), *momento* (M1, M2 e M3) e *interações* especificando a distribuição *Poisson*. *Tempo* e *resíduos* foram inseridos como efeito aleatório. *Animal(categoria)* foi usado como *erro termo*. *ECC* foi utilizado como *covariável* ao modelo. Além disso, especificou a opção, *ddfm = kenwardroger* para correção dos graus de liberdade das variâncias. A estrutura de covariância selecionada foi *não estruturada de primeira ordem [UN(1)]*, a qual forneceu

o melhor ajuste para estas análises de acordo com o critério de informação de *Akaike*. O teste *post hoc* de diferença significativa incluiu ajuste de *Tukey* para determinar diferenças entre *grupo*, *momento* e *interação grupo*tempo*. Os valores foram apresentados como média $\pm$ SEM. Diferenças foram aceitas para valores de $P \leq 0,05$.

10. RESULTADOS

Os resultados apresentados na Tabela 15 exibem as características produtivas e reprodutivas entre os grupos experimentais. Obedecendo as premissas impostas no delineamento experimental vacas FL-RS apresentaram maior DEL do que vacas ILI e ILF ($P = 0,001$). Foi observado diferenças no ECC ($P = 0,04$) cujo grupo VS-RS apresentou maior ECC, seguido por vacas FL-RS e ILF e vacas ILI. O grupo de vacas ILI apresentou maior produção de leite média que vacas ILF e vacas FL-RS ($P=0,04$).

Os resultados dos parâmetros bioquímicos séricos (Tabela 16) demonstraram interações entre grupo*tempo para ureia ($P = 0,02$), triglicérides ($P = 0,003$) e NEFA ($P = 0,05$) e foram portanto, apresentados graficamente na Figura 22. Os gráficos demonstram que em um período de 64 dias, observou-se que vacas ILI apresentaram diminuição da concentração sérica de ureia. O grupo VS-RS apresentou significativo aumento de NEFA e queda de triglicérides ao longo do tempo, como também, maior concentração sanguínea de Colesterol [Total ($P=0,05$) e LDL ($P = 0,05$)] do que vacas em lactação.

Os resultados dos parâmetros bioquímicos avaliados no líquido folicular (Tabela 17) demonstraram interações entre grupo*tempo para NEFA ($P = 0,04$), BHBA ($P = 0,05$) e LDL ($P = 0,004$) e foram portanto, apresentados de forma gráfica na Figura 23. Os gráficos demonstram que em um período de 64 dias, vacas ILF e ILI apresentaram incremento da concentração de LDL. O grupo FL-RS apresentou significativa queda de NEFA e aumento de BHBA. Vacas FL-RS e VS-RS apresentaram diminuição da concentração de LDL.

Os resultados da concentração plasmática de glicose em resposta ao TTG (Tabela 18) não apresentaram interação entre grupo*momento ($P > 0,05$) e momento ($P > 0,05$) para nenhuma das variáveis estudadas. Foi observado efeito de grupo cujo vacas FL-RS e VS-RS demonstraram maior concentração basal de glicose ($P = 0,0004$).

Na Figura 24 foi apresentado o perfil de glicose circulante em resposta TTG. Não foi observado interação tempo*categoria ($P > 0,05$) e efeito de momento ($P > 0,05$) demonstrando não haver diferenças entre incremento de glicose sanguíneo após o fim da infusão do TTG nos dois momentos avaliados. No entanto, foi observado efeito de grupo cujo vacas FL-RS e VS-RS demonstraram maior concentração basal de glicose ($P = 0,02$). Foi observado efeito de tempo ($P < 0,001$) demonstrando súbito incremento de glicose após a o fim da infusão e decaimento da mesma, e decaimento da mesma, retornando as concentrações basais após 120 min.

Os resultados da concentração plasmática de insulina em resposta ao TTG (Tabela 19) não demonstraram diferenças entre os grupos quanto ao nível de INS, k e T_{1/2} (min) ($P > 0,05$). Porém o pico de INS e o Δ máx. ($\mu\text{UI/mL}$) foram maiores para o grupo VS-RS [(318,5 $\pm$ 44,6^a; $P=0,0007$) e (268,5 $\pm$ 37,9^a; $P=0,005$)], respectivamente, do que para os grupos ILF [(173,3 $\pm$ 27,7^b e 132,2 $\pm$ 28,8^b)], ILI [(181,1 $\pm$ 26,0^b e 142,1 $\pm$ 21,3^b)] e FL-RS [(238,3 $\pm$ 42,0^{ab} e 197,7 $\pm$ 41,9^{ab})]. Foram observadas diferenças entre os grupos para a concentração de INS no intervalo de 5-60min [ILF=7486,3 $\pm$ 1168,9^{ab}; ILI=6880,4 $\pm$ 1066,8^b FL-RS=9416,9 $\pm$ 1396,9^{ab}; VS-RS=11907,6 $\pm$ 1954,4^a; $P=0,05$].

Na Figura 25 foi apresentado o perfil de insulina circulante em resposta TTG. Foi observado interação grupo*tempo ($P = 0,001$) verificando, que o período entre 5 e 30 min após o fim da infusão de glicose, exibiu maior pico glicêmico para VS-RS que em vacas em início de lactação. Vacas FL-RS demonstraram valores intermediários aos demais grupos. Foi observado efeito de tempo ($P < 0,001$) demonstrando súbito incremento de insulina após a o fim da infusão de glicose e decaimento da mesma, retornando as concentrações basais após 120 min. Não foi observado interação entre grupo*momento ($P > 0,05$) e momento ($P > 0,05$)

Os resultados da produção in vitro de embriões (Tabela 20) demonstram que a CFA foi maior em vacas FL-RS e VS-RS quando comparada à ILI mas similar à ILF (respectivamente 16,7 $\pm$ 2,2^a; 18,1 $\pm$ 2,6^a; 9,3 $\pm$ 1,1^b; 14,2 $\pm$ 1,6^{ab}; $P=0,04$). Houve diferença no nº oócitos viáveis entre os grupos (ILF = 5,0 $\pm$ 0,7^{bc}; ILI = 3,2 $\pm$ 0,5^c; FL-RS= 7,7 $\pm$ 1,0^{ab}; VS-RS=8,0 $\pm$ 1,4^a; $P=0,02$). A taxa de oócitos viáveis foi maior em vacas FL-RS e VS-RS quando comparado à ILF mas similar à ILI (57,7%^a; 52,0%^a; 42,5%^b; 44,0%^{ab}, $P=0,05$). Houve diferença na taxa de blastocistos entre os grupos (ILF=15,0%^{ab}; ILI=8,4%^b; FL-RS=20,4%^a; VS-RS=17,8%^{ab}; $P=0,03$). Não foram observadas diferenças na taxa de prenhez [Figura 26; ILF=45,0% (9/20); ILI=40,0% (2/5) FL-RS=41,4% (17/41); VS-RS=38,7% (12/31); $P=0,81$].

Referente a evolução do escore de condição corporal (ECC) e peso vivo (PV; kg) dos animais, verificou-se interação entre grupo*tempo para ambas variáveis (Figura 27; $PECC = 0,05$; $PPV = 0,02$), sendo que vacas VS-RS apresentaram maior ECC e PV do que os demais grupos. Vacas FL-RS apresentaram valores intermediários e vacas ILI e ILF apresentaram menor ECC e PV ao final do estudo.

Tabela 15 – Características produtivas e reprodutivas de vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação (*após parto fisiológico ou após protocolo hormonal de indução de lactação, DEL < 120 dias*), no terço final da lactação (*DEL > 300 dias - repetidora de serviço*) e vacas secas (*período seco > 300 dias*) [Nova Odessa – SP / agosto a dezembro de 2016]

Item	Tratamentos				P value
	Início Lactação Lact. Fisiológica (n=9)	Início Lactação Indução Lact (n=9)	Final Lactação Repetidora Serviço (n=8)	Vaca Seca (n=9)	
Paridade	2,7±0,14	2,3±0,18	2,7±0,24	2,5±0,15	0,96
ECC (1 a 5)	2,7±0,04 ^c	3,0±0,04 ^b	3,2±0,08 ^b	3,7±0,09 ^a	0,04

Vacas em lactação					
Produção de leite, kg/dia	28,7±1,4 ^a	17,7±1,6 ^b	16,8±1,3 ^b	-	0,04
DEL, dias	103±8,8 ^b	46±5,8 ^c	436±11,1 ^a	-	0,001

Vacas Secas					
Período seco, dias	-	-	-	305±7	-

Fonte: Mingoti (2018).

¹Os dados estão apresentados em Média ± EPM.

Tabela 16 – Parâmetros bioquímicos séricos de vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação (após parto fisiológico ou após protocolo hormonal de indução de lactação, DEL < 120 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 300 dias).

Item	Tratamentos				P value		
	Início Lactação Lact. Fisiológica (n=9)	Início Lactação Indução Lact. (n=9)	Final Lactação Repetidora Serviço (n=8)	Vaca Seca (n=9)	Grupo	Tempo	Interação Grupo*Tempo
Ureia, mg/dL	32,1±3,3	33,9±1,9	31,4±2,1	25±1,3	0,57	0,10	0,02
Colesterol, mg/dL	108±6,2 ^b	101±11,2 ^b	118±8,3 ^{ab}	127±3,4 ^a	0,05	0,06	0,77
Triglicérides, mg/dL	13,9±1,0	13,7±0,8	19,2±1,1	23,2±2,0	0,06	0,05	0,003
NEFA, µmol/L	0,41±0,05	0,39±0,05	0,36±0,03	0,42±0,04	0,39	<0,0001	0,05
BHBA, µmol/L	0,42±0,02	0,36±0,02	0,42±0,03	0,36±0,02	0,20	0,29	0,50
HDL, mg/dL	78,5±3,4	71,8±5,3	73,3±3,6	76,9±2,1	0,09	0,10	0,47
LDL, mg/dL	12,6±0,8 ^b	12,4±1,02 ^b	12,3±0,96 ^b	15,3±0,8 ^a	0,05	0,88	0,75

Fonte: Mingoti (2018).

¹Os dados estão apresentados em Média ± EPM. Valor P ≤ 0,05. ²64 dias de intervalo de tempo entre testes (momento 1 = 03/10/2016; momento 2 = 06/12/2016).

Figura 21 – Gráficos de interações tempo*categoria dos parâmetros bioquímicos séricos [Ureia, Triglicérides e NEFA] em um intervalo de 64 dias em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação [após parto fisiológico (n=9) ou após protocolo hormonal de indução de lactação (n=9), DEL < 120 dias], no terço final da lactação (n=8; DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (n=9; período seco > 300 dias) [Nova Odessa – SP / agosto a dezembro de 2016].

Fonte: Mingoti (2018).

Tabela 17 – Parâmetros bioquímicos avaliados no líquido folicular de vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação (após parto fisiológico ou após protocolo hormonal de indução de lactação, DEL < 120 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 300 dias).

Item	Tratamentos				P value		
	Início Lactação Lact. Fisiológica (n=9)	Início Lactação Indução Lact (n=9)	Final Lactação Repetidora Serviço (n=8)	Vaca Seca (n=9)	Grupo	Tempo	Interação Grupo*Tempo
Ureia, mg/dL	32,6±2,8	31,5±2,9	25,3±1,5	27,4±3,2	0,45	0,06	0,33
Colesterol, mg/dL	47,7±2,7 ^c	48,0±3,5 ^c	61,7±4,9 ^b	71,6±3,8 ^a	<0,0001	0,75	0,15
Triglicérides, mg/dL	4,6±0,7 ^c	5,5±1,6 ^c	7,3±1,4 ^b	11,5±3,0 ^a	0,05	0,70	0,73
NEFA, µmol/L	0,27±0,03	0,27±0,03	0,31±0,05	0,23±0,03	0,58	0,23	0,04
BHBA, µmol/L	0,40±0,02	0,45±0,04	0,60±0,05	0,46±0,03	0,001	0,01	0,05
HDL, mg/dL	43,7±1,5	32,4±3,3	37,3±2,6	35,8±2,8	0,20	0,22	0,78
LDL, mg/dL	10,2±1,4	5,5±1,1	8,6±2,0	5,5±1,1	0,07	0,66	0,004

Fonte: Mingoti (2018).

¹Os dados estão apresentados em Média ± EPM. Valor P ≤ 0,05 ²Período de 64 dias entre os testes (momento 1 = 03/10/2016; momento 2 = 06/12/2016).

Figura 22 - Gráficos de interações tempo*categoria dos parâmetros bioquímicos séricos [NEFA, BHBA e LDL] em um intervalo de 64 dias em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação [após parto fisiológico (n=9) ou após protocolo hormonal de indução de lactação (n=9), DEL < 120 dias], no terço final da lactação (n=8; DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (n=9; período seco > 300 dias) [Nova Odessa – SP / agosto a dezembro de 2016].

Fonte: Mingoti (2018).

Tabela 18 – Concentração plasmática de glicose em resposta ao teste de TTG (0,3 g / kg de PV de glicose *i.v.*) de vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação (após parto fisiológico ou após protocolo hormonal IL, DEL < 120 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - RS) e vacas secas (período seco >300 dias)

Item	Tratamentos				P value		
	Início Lactação Lact. Fisiológica (n=9)	Início Lactação Indução Lact (n=9)	Final Lactação Repetidora Serviço (n=8)	Vaca Seca (n=9)	Grupo	Tempo	Interação Grupo*Tempo
Glicose Basal, mg/dL	67,9±0,9 ^b	68,4±0,9 ^b	74±1,5 ^a	74±1,6 ^a	0,0004	0,78	0,48
Pico de Glicose, mg/dL	316,1±11,2	306,9±7,5	339,4±6,4	317,3±13,1	0,18	0,45	0,50
k, % min	1,7±0,1	1,8±0,2	2,1±0,2	2,1±0,1	0,15	0,49	0,51
T _{1/2} , min	44,3±2,9	43,2±3,9	36,8±3,1	35,6±2,2	0,14	0,70	0,90
Δ máx., mg/dL	248,2±11,0	238,5±7,6	265,4±6,4	243,3±13,1	0,30	0,47	0,57
AUC 5–60, mg/dL × min	11764,1±615,1	11370,7±393,9	11580,1±471,1	10809,1±396,4	0,47	0,83	0,32
AUC 5–120, mg/dL × min	17859,9±983,3	16882,7±758,1	17302,7±810,2	16499±667,5	0,65	0,87	0,42

Fonte: Mingoti (2018). Os dados estão apresentados em Média ± EPM. Valor $P \leq 0,05$. 2. 64 dias de intervalo de tempo entre testes (momento 1 = 03/10/2016; momento 2 = 06/12/2016). 3. Máx. = concentração máxima de glicose - concentração basal de glicose; k = taxa de depuração da glicose = $[(\ln \text{glicose } t_{10} - \ln \text{glicose } t_{40}) / (t_{40} - t_{10})] \times 100$; glicose t_{10} e insulina t_{40} foram respectivamente as concentrações de glicose 10 e 40 min após a infusão de glicose; T_{1/2} = tempo para atingir metade da concentração máxima de glicose $(0,693 / k) \times 100$; AUC 5–60 = área sob a curva para concentração de glicose no intervalo de 5 a 60 minutos; AUC 5–120 = área sob a curva para concentração de glicose no intervalo de 5 a 120 minutos.

Figura 23 - Perfil de glicose circulante (Média ± EPM) em resposta ao teste de tolerância à glicose intravenosa (GTT; 0,3 g / kg de PV de glicose *i.v.*) de vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação [após parto fisiológico (n=9) ou após protocolo hormonal de indução de lactação (n=9) DEL < 120 dias], no terço final da lactação (n=8; DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (n=9; período seco > 300 dias).

Fonte: Mingoti (2018).

Foram realizados dois testes de tolerância à glicose dentro de um período de 64 dias (momento 1 = 03/10/2016 e momento 3 = 06/12/2016)

Tabela 19 – Concentração plasmática de insulina em resposta ao teste de tolerância à glicose (0,3 g / kg de PV de glicose *i.v.*) de vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação (após parto fisiológico ou após protocolo hormonal de indução de lactação, DEL < 120 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 300 dias) [Nova Odessa – SP / agosto a dezembro de 2016]

Item	Tratamentos				P value		
	Início Lactação Lact. Fisiológica (n=9)	Início Lactação Indução Lact (n=9)	Final Lactação Repetidora Serviço (n=8)	Vaca Seca (n=9)	Grupo	Tempo	Interação Grupo*Tempo
Insulina, $\mu\text{UI/mL}$	41,1 $\pm$ 5,1	39 $\pm$ 6,6	40,6 $\pm$ 4,8	50 $\pm$ 11,5	0,74	0,15	0,69
Pico de Insulina, $\mu\text{UI/mL}$	173,3 $\pm$ 27,7 ^b	181,1 $\pm$ 26 ^b	238,3 $\pm$ 42 ^{ab}	318,5 $\pm$ 44,6 ^a	0,007	0,10	0,17
k, % min	1,1 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,3	0,40	0,07	0,67
T $\frac{1}{2}$, min	51 $\pm$ 34,2	30,3 $\pm$ 37,1	236 $\pm$ 186,7	55,4 $\pm$ 10	0,30	0,40	0,27
Δ máx., $\mu\text{UI/mL}$	132,2 $\pm$ 28,8 ^b	142,1 $\pm$ 21,3 ^b	197,7 $\pm$ 41,9 ^{ab}	268,5 $\pm$ 37,9 ^a	0,005	0,14	0,12
AUC 5–60, $\mu\text{UI/mL} \times \text{min}$	5519,56 $\pm$ 727,29 ^{ab}	4193,18 $\pm$ 602,34 ^b	10458,69 $\pm$ 2626,30 ^{ab}	10909,45,6 $\pm$ 3305,46 ^a	0,05	0,11	0,34
AUC 5–120, $\mu\text{UI/mL} \times \text{min}$	6514,16 $\pm$ 648,06	6230,40 $\pm$ 1026,55	13526,24 $\pm$ 2883,188	15748,38 $\pm$ 5398,81	0,10	0,10	0,51

Fonte: Mingoti (2018). ¹Os dados estão apresentados em Média $\pm$ EPM. Valor $P \leq 0,05$ ² Δ max = concentração máxima de insulina - concentração basal de insulina; k = taxa de depuração da insulina = $[(\ln \text{insulina } t_{10} - \ln \text{insulina } t_{40}) / (t_{40} - t_{10})] \times 100$; insulina t_{10} e insulina t_{40} foram respectivamente as concentrações de insulina 10 e 40 min após a infusão de glicose; T $\frac{1}{2}$ = tempo para atingir metade da concentração máxima de insulina $(0,693 / k) \times 100$; AUC 5–60 = AUC de insulina no intervalo de 5 a 60 minutos; AUC 5–120 = AUC de insulina no intervalo de 5 a 120 minutos.

Figura 24 – Perfil de insulina circulante (Média $\pm$ EPM) em resposta ao teste de tolerância à glicose intravenosa (GTT; 0,3 g / kg de PV de glicose *i.v.*) de vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação [após parto fisiológico (n=9) ou após protocolo hormonal de indução de lactação (n=9); DEL < 120 dias], no terço final da lactação (n=8; DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (n=9; período seco > 300 dias).

Fonte: Mingoti (2018).

Obs.: Foram realizadas 2 TTG dentro de um período de 64 dias (momento 1 = 03/10/2016 e momento 3 = 06/12/2016). Dentro de um mesmo tempo diferenças entre grupos ($P \leq 0,05$) são representadas com um asterisco (*)

Tabela 20 – Produção *in vitro* de embriões de vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação (após parto fisiológico ou após protocolo hormonal de indução de lactação, DEL < 120 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 300 dias).

Item	Tratamentos				P value		
	Início Lactação Lact. Fisiológica (n=9)	Início Lactação Indução Lact (n=9)	Final Lactação Repetidora Serviço (n=8)	Vaca Seca (n=9)	Grupo	Tempo	Interação Grupo*Tempo
Folículos por OPU, n	14,2±1,6 ^{ab}	9,3±1,1 ^b	16,7±2,2 ^a	18,1±2,6 ^a	0,04	0,29	0,97
Oócitos recuperados por OPU	11,8±1,2 ^b	7,2±0,9 ^b	13,5±1,8 ^{ab}	14,5±2,1 ^a	0,05	0,04	0,50
Taxa de recuperação, % ¹	78,2% (266/340)	76,4% (165/214)	78,7% (270/334)	76,7% (334/417)	0,30	0,0001	0,07
Oócitos viáveis, n	5,0±0,7 ^{bc}	3,2±0,5 ^c	7,7±1,0 ^{ab}	8,0±1,4 ^a	0,02	0,55	0,80
Taxa de oócitos viáveis, % ²	42,5% ^b (120/266)	44,0% ^{ab} (74/165)	57,7% ^a (153/270)	52,0% ^a (185/334)	0,05	0,20	0,79
Clivados por OPU, n	3,7±0,6 ^b	2,0±0,4 ^b	6,6±1,1 ^a	5,7±1,0 ^{ab}	0,006	0,06	0,31
Taxa de clivagem, % ³	30,2% ^b (89/266)	29,2% ^b (47/165)	44,6% ^a (132/270)	38,7% ^b (130/334)	0,002	0,006	0,49
Blastocistos por OPU	1,8±0,4	0,65±0,2	3,4±0,8	2,5±0,5	0,07	0,92	0,27
Taxa de blastocistos, % ⁴	15,0% (44/266) ^{ab}	8,4% (15/165) ^b	20,4% (67/270) ^a	17,8% (58/334) ^{ab}	0,03	0,98	0,36
Taxa de desenvolvimento embrionário, % ⁵	47,8% (44/89)	31,1% (15/47)	46,6% (67/132)	46,1% (58/130)	0,46	0,19	0,74

Fonte: Mingoti (2018).

¹Taxa de recuperação = Total de oócitos recuperados / Total de folículos puncionados; ² Taxa de Oócitos viáveis = Total de viáveis / Total de oócitos recuperados; ³ Taxa de clivagem = Total de oócitos clivados / Total de oócitos recuperados; ⁴ Taxa de blastocistos = Total de blastocistos / Total de oócitos recuperados; ⁵ Taxa de desenvolvimento embrionário = Blastocistos / Clivados; ⁶ Os dados estão apresentados em Média ± EPM. Valor-P ≤ 0,05; ⁷ Foram realizadas 3 OPUs dentro de um período de 64 dias (momento 1 = 03/10/2016, Momento 2 = 08/11/2016; momento 3 = 06/12/2016) [Nova Odessa – SP / agosto a Dezembro, 2016]

Tabela 21 – Secreção de insulina (A) e captação de glicose (B) em resposta ao teste de tolerância à glicose em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação (após parto fisiológico ou após protocolo hormonal de indução de lactação, DEL < 120 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 300 dias) [Nova Odessa – SP / agosto a dezembro de 2016].

A - Secreção de insulina - μ IU Insulina / mg Glicose

Grupo	$(\Delta \text{ máx Insulina, } \mu\text{IU} \times 100 \text{ mL/dL}) / (\Delta \text{ máx Glicose mg/dL})$	Valor
ILF	$(132,2 \times 100) / (248,2)$	53.26
ILI	$(142,1 \times 100) / (238,5)$	59.58
FL-RS	$(197,7 \times 100) / (265,4)$	74.49
VS-RS	$(268,5 \times 100) / (243,3)$	110.3576
IL (ILF & ILI)	$[(132,2+142,1) / 2] * 100 / (248,2+238,5) / 2)$	56.36
% de secreção de insulina por mg de aumento glicêmico		
ILF / ILI	53,26/59,58	89%
FL-RS / IL	74,49/56,36	132%
VS-RS / IL	110,36/56,36	196%
VS-RS / FL-RS	110,36/74,49	148%

Fonte: Mingoti (2018).

ILF – vacas no início da lactação após parto fisiológico)

ILI – vacas no início da lactação após indução de lactação

FL-RS – Vacas no terço final da lactação - repetidoras de serviço

VS-RS – Vacas secas - repetidoras de serviço

IL (ILF & ILI) – Vacas no terço inicial da lactação – Lactação fisiológica e lactação induzida

B - Captação de glicose durante os primeiros 120 min do TTG

Grupo	$(\text{AUC } 5\text{--}120 \text{ min mg/dL glicose} \times 1 \text{ dL} / 100 \text{ mL}) / (\text{AUC } 5\text{--}120 \text{ mg/dL insulina})$	Valor
ILF	$(17859,9 / 100) / (6514,16)$	0.0274
ILI	$(16882,7 / 100) / (6230,40)$	0.0271
FL-RS	$(17302,7 / 100) / (13526,24)$	0.0128
VS-RS	$(16499,0 / 100) / (15748,38)$	0.0105
IL (ILF & ILI)	$[(17859,9+16882,7) / 2] / 100 / [(8514,16+6230,40) / 2]$	0.0236
% de captação de glicose durante os primeiros 120 min do TTG		
ILF / ILI	0,0274/0,0271	99%
FL-RS / IL	0,128/0,0236	54%
VS-RS / IL	0,0105/0,0236	44%
VS-RS / FL-RS	0,0105/0,0128	82%

Fonte: Mingoti (2018).

ILF – vacas no início da lactação após parto fisiológico)

ILI – vacas no início da lactação após indução de lactação

FL-RS – Vacas no terço final da lactação - repetidoras de serviço

VS-RS – Vacas secas - repetidoras de serviço

IL (ILF & ILI) – Vacas no terço inicial da lactação – Lactação fisiológica e lactação induzida

Figura 25 - Taxa de prenhez de embriões vitrificados de vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação (após parto fisiológico ou após protocolo hormonal de indução de lactação, DEL < 120 dias), no terço final da lactação (DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (período seco > 300 dias) após transferências de embriões em tempo fixo em receptoras Nelore (*Bos indicus*) [Andradina – SP / Janeiro, 2018].

Fonte: Mingoti (2018).

Figura 26 – Evolução do escore de condição corporal e peso vivo (kg) em vacas Holandesas (*Bos taurus*) no terço inicial da lactação [após parto fisiológico (n=9) ou após protocolo hormonal de indução de lactação (n=9); DEL < 120 dias], no terço final da lactação (n=8; DEL > 300 dias - repetidora de serviço) e vacas secas (n=9; período seco > 300 dias) [Nova Odessa – SP / agosto a dezembro de 2016].

Fonte: Mingoti (2018).

* Dentro de um mesmo tempo diferenças entre grupos ($P \leq 0,05$) são representadas com um asterisco (*)

11. DISCUSSÃO GERAL

O perfil circulante de insulina em resposta ao teste de tolerância à glicose indicou o estabelecimento do quadro RPI em vacas RS. Esse quadro se intensificou em vacas RS secas, simultaneamente ao aumento do escore de condição corporal e do peso vivo (kg), confirmando a hipótese inicial do presente estudo. Os resultados foram indicativos de que vacas RS possuem baixa sensibilidade a insulina e elevada secreção de insulina em resposta ao TTG, quando comparadas as vacas no terço inicial da lactação. Durante o período seco, observou-se diminuição da sensibilidade e aumento de intensidade na secreção de insulina em resposta ao TTG caracterizando um agravamento na RPI. Entretanto, a indução de lactação foi efetiva na mudança deste quadro; houve melhora da sensibilidade e diminuição na secreção de insulina em resposta ao TTG. No entanto, não foi verificado incremento na qualidade oocitária e na *PIVE*, uma vez que vacas RS em lactação e secas apresentaram taxa de blastocisto e número de blastocisto por OPU maior do que de vacas no terço inicial da lactação. Isso foi verificado nos três experimentos realizados, rejeitando a hipótese inicial do presente estudo.

A RPI ocorre quando há redução na sensibilidade dos tecidos para responder às concentrações fisiológicas de insulina (BOURA-HALFON; ZICK, 2009a). O mecanismo de RPI pode se estabelecer pela diminuição tanto na capacidade de resposta à insulina quanto na sensibilidade à insulina (DE AZEVEDO e COELHO, 2016).

O trabalho de De Koster e Opsomer (2013) apresenta a cinética bioquímica da RPI e demonstra que, quando ocorre redução da capacidade de resposta à insulina, há uma queda da curva dose-resposta da mesma. A diminuição na sensibilidade à insulina ocorre quando há uma alteração da curva dose-resposta, ou seja, quando é necessária elevada secreção de insulina para controlar glicose sanguínea (KAHN, 1978; OIKAWA; OETZEL, 2006; BOSSAERT et al., 2009).

Sensibilidade a insulina

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura diagnosticam a RPI em vacas leiteiras a partir da concentração de circulante de insulina e glicose, utilizando os testes de HOMA, Log10HOMA, HOMA-1, QUICKI, RQUICKI e RQUICKI-BHB (ALVES-NORES et al., 2017). Esses autores verificaram que tais índices são derivados de pesquisas com base em humanos e não parecem adequados para avaliar a sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina em vacas leiteiras no início da lactação. Entretanto, Sales (2011) caracterizaram a RPI levando em consideração a maior secreção de insulina [pico, insulina (Δ máx.) e AUC] em resposta ao tratamento com glicose (TTG). Contudo, as alterações da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos podem ser determinadas por dois fatores: 1) a maior secreção de insulina em resposta à infusão de glicose (SALES, 2011; OLIVEIRA et al., 2016) e 2) menor captação de glicose, mesmo após o aumento da secreção de insulina (OLIVEIRA et al., 2016). Esses dois fatores foram utilizados como diagnóstico da RPI neste estudo [Secreção de insulina: (Δ máx Insulina, μ IU $\times$ 100 mL/dL) / (Δ máx Glicose mg/dL) e Captação de glicose: (AUC 5–120 min mg/dL glicose $\times$ 1 dL/100 mL) / (AUC 5–120 μ IU/mL ins)].

No presente estudo, os resultados do TTG que foram utilizados para o cálculo da sensibilidade à insulina demonstraram que, em resposta à infusão de 0,3mg glicose/kg PV, as vacas RS secretaram 53% [Exp. 1], 216% [Exp. 2] ou 32% [Exp. 3] mais insulina e captaram 40% [Exp.], 50% [Exp. 2] ou 46% [Exp. 3] menos de glicose quando comparadas as vacas no terço inicial de lactação. Esses achados foram indicativos do estabelecimento do quadro de RPI nas vacas RS em lactação.

Durante o período seco, as vacas RS secretaram 96% [Exp. 2] e 48% [Exp. 3] mais insulina e captaram 56% [Exp. 2] e 18% [Exp. 3] menos glicose que as vacas no terço inicial da lactação e as vacas RS em lactação, respectivamente. Ainda, as vacas com lactação induzida secretaram 11% [Exp. 3] menos insulina e captaram a mesma quantidade de glicose que vacas paridas em fases semelhantes de lactação, demonstrando que o protocolo de indução de lactação foi eficiente em alterar o perfil metabólico, revertendo o quadro de RPI presente nas vacas RS.

Outros estudos buscaram verificar a possível associação entre uma dieta de alta energia e um estado hiperinsulinêmico. O modelo utilizado por Sales, (2011) em vacas Holandesas não lactantes alimentadas com alta energia (170% das necessidades energéticas

de manutenção) por um intervalo prolongado (119 dias) evidenciou o estabelecimento do quadro de RPI com base no TTG quando comparadas alimentadas com dieta controle (100% das necessidades energéticas de manutenção). Durante este teste, não houve diferença entre os grupos para todas as variáveis relacionadas às concentrações circulantes de glicose, (por exemplo, glicose basal = 67,8 vs. 73,1 mg/dL; $P=0,09$; pico glicêmico = 222,1 $\pm$ 12,2 e 235,9; 6,5 mg/dL; $P=0,29$, taxa de metabolismo = 1,8 $\pm$ 0,4 e 2,3 $\pm$ 0,2% / min, $P=0,16$). No entanto, a concentração de insulina necessária para controlar a glicose infundida foi maior no grupo de alta energia (concentrações basais de insulina = 7,3 $\pm$ 1,6 e 23,2 $\pm$ 8,9 mUI/mL; $P=0,05$; pico das concentrações de insulina $\geq$ 107,9 $\pm$ 19,0 e 192,4 $\pm$ 29,3 mg/dL; $P=0,03$) evidenciando a RPI em vacas alimentadas com dieta de alta energia.

Leiva et al. (2014), estudando vacas leiteiras não lactantes consumindo energia excessiva (177% energia de manutenção), evidenciou redução da sensibilidade à insulina (durante um TTG) indicando estabelecimento do quadro de RPI, em comparação a vacas consumindo quantidades adequadas de energia (100% energia de manutenção). Leiva et al., (2015) encontraram resultado semelhante ao fornecer energia excessiva às vacas leiteiras em lactação (160% das necessidades de energia de manutenção): houve aumento da resistência à insulina (TTG) durante o estudo (76-286 DEL) em comparação com o grupo de controle.

Com base nestes relatos de literatura e dados do presente estudo, sugere-se que vacas leiteiras em estágios avançados de lactação ou secas quando alimentadas com dietas de alta energia estejam predispostas ao desenvolvimento de RPI.

De maneira interessante, no Exp. 1, observou-se que 108% mais insulina é secretada e 20% menos de glicose é captada em vacas RS vazias quando comparadas às vacas RS prenhas (terço final da lactação). Ao contrário do músculo esquelético e do tecido adiposo, os tecidos fetais realizam um processo insulino independente para o transporte de glicose (HAYIRLI, 2006). Estudos evidenciaram que para preservar glicose suficiente para o crescimento e desenvolvimento fetal, mudanças homeoréticas no metabolismo da glicose ocorrem em todo o corpo durante a gestação (DE KOSTER; OPSOMER, 2013). Segundo De Koster e Opsomer, (2013), existem cerca de 13 isoformas de transportadores de glicose (GLUTs), que atuam conforme sua distribuição no organismo. Verifica-se que nos tecidos fetais, glândula mamária e fígado há predominância de GLUT-1, que independe da ação da insulina (ZHAO; KEATING, 2007). Dessa forma, a predominância de transportadores de glicose independentes de insulina nos tecidos fetais pode justificar as diferenças encontradas na sensibilidade a insulina entre vacas prenhas no terceiro final da lactação e vacas RS [Exp.

1]. Além disso, vacas secas apresentam menor demanda energética que vacas gestantes (NRC 2001), o que predispõem ao aumento da reserva corporal e ao estabelecimento da RPI quando submetidas a dieta semelhante.

Perfil bioquímico

Confrontando os dados bioquímicos de vacas nas diferentes fases da lactação e durante o período seco, observa-se um padrão de alteração no perfil do metabolismo lipídico. Resultados dos Exp. 1, 2 e 3 demonstraram maior concentração plasmática de triglicérides, colesterol total e LDL no soro sanguíneo em vacas RS quando comparadas com vacas no terço inicial de lactação. Durante o período seco, observou-se incremento desses metabólitos, destacando aumento na concentração de triglicérides, colesterol total e LDL plasmático em vacas secas quando comparadas as vacas em lactação [início e final (RS) da lactação]. Referente ao HDL, verificou-se que em determinados momentos esse metabólito se mantém inalterado (no Exp. 1 e 3 não se verificou diferença entre vacas no início da lactação e vacas RS), com diminuição durante a evolução da lactação e durante o período seco (no Exp. 2 ocorreu redução em vacas secas). O aumento nos níveis circulantes de triglicérides, colesterol total e LDL, associado à queda de HDL, é denominado dislipidemia e é um dos indicadores que caracterizam o quadro de RPI (TASKINEN, 2003).

Devido a ineficiência da insulina em promover adequada captação de glicose pelos tecidos periféricos e incapacidade em suprimir a gliconeogênese hepática (MADEIRA et al., 2008), a resistência insulínica se caracteriza pela dislipidemia, composta por elevada concentração plasmática de triglicerídeos (hipertrigliceridemia), baixo conteúdo de lipoproteína de alta densidade (HDL) e alta concentração de lipoproteína de baixa (LDL; TASKINEN, 2003; SHAH et al., 2007; MATIKAINEN; TASKINEN, 2008; FERNÁNDEZ-JULIÁN et al., 2009; HABIB et al., 2009; SALILEW-WONDIM et al., 2015). O desenvolvimento da RPI é acompanhado por hiperinsulinemia (ADAMIAK, 2005; BARUSELLI et al., 2016). Esse quadro é necessário para compensar a diminuição da ação da insulina e para manter a glicose circulante próxima ao normal (REAVEN, 1988). Apesar da hiperinsulinemia compensatória prevenir quadros exacerbados de hiperglicemia, retardando assim o desenvolvimento ou as manifestações clínicas do Diabetes tipo 2 (*Mellitus*), ela é responsável por aumentar a concentração plasmática de TG e diminuir o colesterol associado ao HDL (REAVEN, 2005). A HDL rica em TG é avidamente

metabolizada pela lipase hepática, e rapidamente retirada da circulação diminuindo, assim, a disponibilidade HDL circulante para participar do transporte de colesterol. Portanto, quanto maior a concentração de LDL, menor será a de HDL circulante (GD; MC; RA, 1997). Essa via metabólica poderia explicar os resultados verificados nos Exp. 1, 2 e 3 que demonstraram maior concentração plasmática de triglicérides, colesterol total e LDL no soro sanguíneo em vacas RS em lactação e secas (RPI presente) quando comparadas com vacas no terço inicial de lactação (RPI ausente). Além disso, a dislipidemia causada pelo estabelecimento do quadro de RPI em vacas RS em lactação e o agravamento do mesmo em vacas secas pode explicar a diminuição do HDL encontrado no Exp. 2.

Estudos realizados tanto em vacas *Bos indicus* como em vacas *Bos taurus* submetidas a dietas com alta energia (170% da energia de manutenção) demonstraram que vacas que receberam alta energia na dieta apresentaram maiores níveis glicose, colesterol e BHBA no soro sanguíneo durante o período experimental. (SALES, 2011). No entanto, vacas que receberam dieta de manutenção apresentaram aumento nos níveis de nitrogênio ureico. Sales, (2011) não verificaram interação entre dieta e raça e tempo na concentração de NEFA no soro sanguíneo, semelhante ao verificado no Exp. 1 e 2 desse estudo.

Entretanto, no Exp. 3 foi observado interação grupo*tempo em vacas secas RS para NEFA. Nessa categoria se verificou incremento da concentração plasmática de NEFA no momento do segundo TTG (~400 dias após o final da lactação). Este fato pode ser devido ao efeito crônico da RPI. A RPI desencadeia maior mobilização de reservas de gordura corporal e posterior liberação de NEFA na circulação para compensar a redução da captação de glicose pelos tecidos do corpo (BARBOUR et al., 2002). O excesso de NEFA pode induzir à fosforilação da serina (substrato do receptor da insulina 1; IRS-1) e diminuir a fosforilação da tirosina (substrato do receptor da insulina 1; IRS-1). Essa via é necessária para a ativação normal da cascata de sinalização da insulina (LE MARCHAND-BRUSTEL et al., 2003). No entanto, apesar da elevação do NEFA circulante nas vacas aos 50 dias de lactação, Oliveira et al., (2016) não verificaram diferença na insulina basal, na concentração de glicose ou no HOMA-IR entre vacas holandesas aos 50 e 100 dias de lactação. Além disso, Oliveira et al., (2016) verificaram que o aumento das concentrações circulantes de NEFA aos 50 DEL não foi acompanhado por qualquer evidência de resistência à insulina ou reduzida capacidade de resposta à insulina induzida por glicose. Entretanto, mesmo com a constatação da redução do NEFA circulante, esses autores verificaram o estabelecimento do quadro de RPI nas vacas aos 150 dias de lactação. Outro estudo também não evidenciou

diferenças nas concentrações de NEFA em vacas no início e final de lactação, apesar de demonstrarem aumento nas concentrações de glicose, insulina, relação insulina/glicose e diferença no HOMA-IR (BARUSELLI et al., 2016). Esses achados da literatura poderiam explicar os resultados do presente estudo em que não se detectou alterações do NEFA circulante após o estabelecimento do quadro RPI em vacas RS em lactação e secas (Exp. 1 e 2).

Fluido folicular

Existe elevada correlação entre o perfil bioquímico sérico e folicular para ureia, colesterol, NEFA e BHBA (SALES, 2011). No presente estudo, o perfil bioquímico avaliado no fluido folicular apresentou variações de colesterol e triglicérides semelhantes entre os grupos experimentais quando comparado ao perfil bioquímico sérico. Nos Exp. 1, 2 e 3, verificou-se que vacas RS possuem maior concentração de triglicérides e colesterol total no fluido folicular do que vacas no terço inicial de lactação. Durante o período seco, observou-se agravamento deste quadro, destacando incremento na concentração de triglicérides e colesterol. Verificou-se grande variação no NEFA entre os três estudos realizados. Referente ao HDL, verificou-se que em determinados momentos esse metabólito se mantém inalterado (no Exp. 1 e 3 não se verificou diferença entre vacas no início da lactação e vacas RS), com diminuição durante a evolução da lactação e durante o período seco (no Exp. 2 ocorreu redução em vacas secas).

Estudos realizados tanto em vacas *Bos indicus* como em vacas *Bos taurus* submetidas a dietas com alta energia (170% da energia de manutenção) demonstraram que as vacas tratadas com alta energia na dieta apresentaram maiores níveis glicose, colesterol e BHBA no líquido folicular durante o período experimental (SALES, 2011). No entanto, as doadoras que receberam dieta de manutenção apresentaram aumento nos níveis de nitrogênio ureico. Sales, (2011) não verificou interação entre dieta e raça e tempo na concentração de NEFA no fluido folicular.

Leroy et al., (2004) observaram que a composição bioquímica do fluido folicular (glicose, NEFA e BHB, colesterol e ureia) está diretamente correlacionada à composição sérica. Essa correlação é importante, pois alterações nos níveis séricos de metabólitos bioquímicos e hormonais refletem diretamente na constituição do líquido folicular.

O excesso de NEFA é um dos fatores relacionados à resistência à insulina (PIRES; PESCARA; GRUMMER, 2007) e pode afetar a qualidade do oócito por indução de apoptose, mesmo durante a maturação das células do cumulus (LEROY, 2005). No entanto, Aardema et al. (2013) demonstraram que, em curto período, as concentrações elevadas de ácido graxo livre no fluido folicular não prejudicam a competência de desenvolvimento do oócito, talvez pelo armazenamento de lipídios nas células do cumulus. Portanto, as células do cumulus podem proteger o oócito de folículos pequenos de quaisquer efeitos negativos de maiores concentrações de NEFA circulantes durante o início da lactação e maiores concentrações de insulina circulante durante a lactação tardia (OLIVEIRA et al., 2016).

Esses resultados da literatura poderiam explicar os achados do presente estudo, que detectou que as vacas RS em lactação e as vacas secas não apresentaram depressão da qualidade oocitária na *PIVE*.

Variáveis reprodutivas

Contrariando a hipótese inicialmente proposta neste estudo, nos três experimentos realizados, as vacas RS em lactação e as vacas secas apresentaram maior taxa de blastocisto e número de blastocistos por OPU que as vacas no terço inicial da lactação. Através do perfil de insulina circulante em resposta ao TTG foi possível demonstrar o estabelecimento do quadro de RPI em vacas RS. Além disso, constatou-se agravamento da RPI em vacas secas. Esse quadro foi associado ao aumento do escore de condição corporal e do peso vivo (kg) dos animais. No entanto, no presente estudo não foi verificada associação negativa entre RPI e a qualidade oocitária e a produção *in vitro* de embriões em vacas Holandesas (*Bos taurus*) RS. Além disso, apesar da indução de lactação em vacas Holandesas (*Bos taurus*) RS alterar o metabolismo e diminuir o quadro de RPI, não foi verificado efetivo positivo na qualidade oocitária e na *PIVE*.

Apesar da escassez de dados relacionados à RPI em bovinos, os mecanismos de ação da insulina em ruminantes são semelhantes aos observados de outras espécies (SASAKI, 2002). O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de outras proteínas intracelulares como a IRS. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI 3-quinase. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando o metabolismo celular

(CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Na RPI, o receptor de insulina, em vez de ser fosforilado em tirosina, é fosforilado em serina, o que atenua a transmissão do sinal através da diminuição da capacidade do receptor após estímulo com insulina (HOTAMISLIGIL et al., 1996). Essas fosforilações inibitórias causam feedback negativo na sinalização insulínica e podem provocar RPI (JIANG et al., 1999).

A hiperinsulinemia pode reduzir a qualidade dos oócitos em novilhas (ADAMIAK, 2005), a produção *in vitro* de embriões (*PIVE*) e a expressão gênica ligada ao metabolismo celular em vacas leiteiras *Bos indicus* não-lactantes (SALES, 2011). Neste último estudo, a associação negativa do consumo excessivo de energia e o aumento das concentrações de insulina na *PIVE* ocorreu somente após 60 dias de tratamento. Assim, a exposição prolongada a uma dieta de alta energia foi necessária para comprometer a qualidade do oócito. Com base na “teoria de Britt” (isto é, a foliculogênese leva pelo menos 60-80 dias entre o recrutamento de folículos primordiais até o estágio de folículo ovulatório; BRITT, 1992), condições adversas como balanço energético excessivo pode levar ao estabelecimento do quadro de RPI que poderia afetar a foliculogênese, levando a subsequentes problemas na competência oocitária e falhas na ovulação.

Em outro estudo, vacas Holandesas na fase inicial de lactação ($110,5 \pm 20,8$ DIM; $n = 70$) e fase final da lactação ($425,6 \pm 21,0$ DIM; $n = 67$) foram submetidas à OPU para avaliar a qualidade do oócito e a *PIVE* (BARUSELLI et al., 2016). Os autores verificaram que além do aumento do número de dias em lactação, as vacas no terço final de lactação apresentaram menor produção de leite, maior número de inseminações prévias e maior ECC que as vacas no terço inicial da lactação. Em relação à *PIVE*, as vacas na fase final lactação apresentaram maior número de oócitos recuperados e viáveis em comparação com as vacas no início de lactação. No entanto, as vacas no terço final da lactação tiveram inferiores taxas de clivagem ($P = 0,08$) e de blastocisto ($P = 0,0005$), além do menor número de embriões produzidos por OPU ($P = 0,06$). Ainda, as vacas no terço final de lactação apresentaram maior RPI do que as vacas no início de lactação, com base na avaliação do modelo de homeostase de resistência à insulina (HOMA-IR).

Corroborando com os achados anteriores, Leiva et al. (2015a) estudaram vacas lactantes com consumo excessivo de energia (160% energia de manutenção). Os autores verificaram que as vacas desenvolveram RPI e apresentaram redução na taxa de blastocistos em comparação com as vacas que consumiram quantidades adequadas de energia. Outros estudos confirmaram o efeito da dieta com alta energia no estabelecimento da RPI (SALES,

2011; LEIVA et al., 2014). Ainda, OLIVEIRA et al.,(2016) verificaram RPI (pelo TTG) em vacas holandesas com 150 dias em lactação. No entanto, os autores não verificaram perda na qualidade dos oócitos aspirados de folículos pequenos e médios.

No presente estudo os embriões produzidos de todos os grupos experimentais (Exp. 2 e 3) foram transferidos simultaneamente em receptoras Nelore. Não foram verificadas diferenças nas taxas de concepção aos 30 dias de gestação dos embriões provenientes de vacas no início de lactação, RS em lactação, vacas secas e vacas com lactação induzida. Existem estudos que demonstram que os embriões após a fecundação e o desenvolvimento inicial passam por seleção e os que se desenvolvem até blastocisto apresentam fertilidade semelhante, independentemente do grupo experimental. Garcia et al. (2015) sugeriram que os embriões que conseguiram ultrapassar o momento de ativação do genoma embrionário teriam o mesmo potencial de alcançar o estágio de blastocisto, justificando as semelhantes taxas de prenhez encontradas entre os grupos experimentais do presente estudo.

Em síntese, com base nos dados disponíveis na literatura, foi levantada a hipótese de que existe associação negativa entre a RPI e a qualidade oocitária e a *PIVE*, manifestada principalmente em vacas RS no terço final de lactação e secas. Entretanto, os dados do presente estudo não permitiram confirmar a hipótese inicialmente proposta. Existe a possibilidade de que as vacas RS em lactação e as vacas secas utilizadas no presente estudo, mesmo com o estabelecimento da RPI, podem não ter tido tempo hábil para apresentar redução na qualidade oocitária e na *PIVE*, uma vez que é necessário tempo prolongado de exposição a dietas com alta energia para induzir a RPI e comprometer a fertilidade.

12. CONCLUSÃO

Foi possível demonstrar o estabelecimento do quadro de RPI em vacas RS e agravamento do mesmo em vacas secas, simultaneamente ao aumento do escore de condição corporal e do peso vivo (kg), confirmando parcialmente a hipótese proposta. Os resultados foram indicativos de que as vacas RS possuem baixa sensibilidade à insulina e elevada secreção de insulina em resposta ao TTG, quando comparadas a vacas no terço inicial da lactação. Durante o período seco, observa-se agravamento deste perfil, destacando diminuição da sensibilidade e aumento de intensidade na secreção de insulina em resposta ao TTG. A indução de lactação demonstrou melhora da sensibilidade e diminuição na liberação de insulina em resposta ao TTG. No entanto, apesar da indução de lactação em vacas Holandesas (*Bos taurus*) RS alterar o metabolismo e diminuir o quadro de RPI não foi verificada melhora na qualidade oocitária e na *PIVE*. Vacas RS em lactação e secas apresentaram maior taxa de blastocisto que vacas no terço inicial da lactação nos três experimentos realizados, rejeitando a hipótese inicial do presente estudo.

13. CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS

Implicações práticas: Atenção aos problemas reprodutivos e uso da técnica de indução a lactação

No presente estudo, a técnica de indução de lactação foi adotada como estratégia para corrigir problemas de fertilidade em vacas repetidoras de serviço. No entanto, essa ferramenta não apresentou os efeitos esperados na qualidade oocitária e na *PIVE*. Mesmo sem apresentar os efeitos desejados, a técnica de indução de lactação pode ser considerada como alternativa para reduzir a taxa de descarte involuntário e, consequentemente, minimizar perdas econômicas referentes a falhas reprodutivas. Essas falhas são mais frequentes em países tropicais como o Brasil, que apresentam problemas de estresse calórico e de adaptação das fêmeas *Bos taurus* aos sistemas de produção de leite. Entretanto, é preciso enfatizar ao criador que a indução de lactação é uma estratégia pontual para minimizar perdas econômicas referente ao descarte involuntário, não devendo ser utilizada de rotina para correção de problemas reprodutivos da propriedade.

BIBLIOGRAFIA

ACCORSI, P. A.; GOVONI, N.; GAIANI, R.; PEZZI, C.; SEREN, E.; TAMANINI, C. Leptin, GH, PRL, insulin and metabolic parameters throughout the dry period and lactation in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 3, p. 217–223, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00581.x>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

ADAMIAK, S. J. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 5, p. 918–926, 2005.

ALDINI, G.; DALLE-DONNE, I.; FACINO, R. M.; MILZANI, A.; CARINI, M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. **Medicinal Research Reviews**, v. 27, n. 6, p. 817–868, nov. 2007.

ALVAREZ, P.; SPICER, L. J.; CHASE, C. C.; PAYTON, M. E.; HAMILTON, T. D.; STEWART, R. E.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; WETTEMANN, R. P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 5, p. 1291–1302, 2000. Disponível em: <<http://www.journalofanimalscience.org/content/78/5/1291.abstract>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

ANDRADE-OLIVEIRA, V.; CAMARA, N. O. S.; MORAES-VIEIRA, P. M. Adipokines as Drug Targets in Diabetes and Underlying Disturbances. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, article ID 681612, 2015. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jdr/2015/681612/>>. Acesso em: 14 ago. 2018.

ARMSTRONG, D. G.; GONG, J. G.; WEBB, R. Interactions between Nutrition and Ovarian Activity in Cattle: Physiological, Cellular and Molecular Mechanisms. **Reproduction**, Cambridge, UK, Supplement, v. 61, p. 403–414, 2003.

AZEVEDO, R. A. De; COELHO, S. G. Resistência á insulina no período de transição de vacas leiteiras. Vol. 13, Nº 06, nov./ dez. de 2016 Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/Artigo_7.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2016. ISSN: 1983-9006.

BARBOUR, L. A.; SHAO, J.; QIAO, L.; PULAWA, L. K.; JENSEN, D. R.; BARTKE, A.; GARRITY, M.; DRAZNIN, B.; FRIEDMAN, J. E. Human placental growth hormone causes severe insulin resistance in transgenic mice. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 186, n. 3, p. 512–517, mar. 2002.

BARTLETT, P. C.; KIRK, J. H.; MATHER, E. C. Repeated insemination in Michigan Holstein-Friesian cattle: Incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. **Theriogenology**, v. 26, p. 309–322, 1986.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N.; GIMENES, L. U.; SA FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; RODRIGUES, C. A.; BO, G. A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1583–1593, 2011a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798580>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; VIEIRA, L. M.; MENDANHA, M. F.; BÓ, G. a. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 47 Suppl 4, p. 134–41, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22827362>>. Acesso em: 15 set. 2014. Acesso em: 13 ago. 2018.

BARUSELLI, P. S.; VIEIRA, L. M.; SA FILHO, M. F.; MINGOTI, R. D.; FERREIRA, R. M.; CHIARATTI, M. R.; OLIVEIRA, L. H.; SALES, J. N.; SARTORI, R. Associations of Insulin Resistance Later in Lactation on Fertility of Dairy Cows. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 263–269, jul. 2016.

BAUMAN, D. E.; BRUCE CURRIE, W. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 9, p. 1514–1529, 1980. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030280831110>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

BEAM, S. W.; BUTLER, W. R. Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 1, p. 121–131, jan. 1998.

BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 9, p. 2804–2819, set. 1995.

BHATTACHARYA, I.; DOMINGUEZ, A. P.; DRAGERT, K.; HUMAR, R.; HAAS, E.; BATTEGAY, E. J. Hypoxia potentiates tumor necrosis factor- α induced expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in white and brown adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 461, n. 2, p. 287–292, maio 2015.

BONNEVILLE-HÉBERT, A.; BOUCHARD, E.; TREMBLAY, D. Du; LEFEBVRE, R. Effect of reproductive disorders and parity on repeat breeder status and culling of dairy cows in Quebec. **Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire**, v. 75, n. 2, p. 147–51, abr. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3062926&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

BOSSAERT, P.; LEROY, J. L. M. R.; DE CAMPENEERE, S.; DE VliegHER, S.; OPSOMER, G. Differences in the glucose-induced insulin response and the peripheral insulin responsiveness between neonatal calves of the Belgian Blue, Holstein-Friesian, and East Flemish breeds. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 9, p. 4404–4411, 2009a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030209707647>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

BOSSAERT, P.; LEROY, J. L. M. R.; DE CAMPENEERE, S.; DE VliegHER, S.; OPSOMER, G. Differences in the glucose-induced insulin response and the peripheral insulin responsiveness between neonatal calves of the Belgian Blue, Holstein-Friesian, and East Flemish breeds. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 9, p. 4404–4411, set. 2009b.

BOSSAERT, P.; LEROY, J. L. M. R.; DE VliegHER, S.; OPSOMER, G. Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 9, p. 3363–3371, set. 2008.

BOURA-HALFON, S.; ZICK, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 4, p. E581–E591, 2009a. Disponível em: <<http://ajpendo.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpendo.90437.2008>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

BOURA-HALFON, S.; ZICK, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 296, p. E581–E591, 2009b.

BRITT, J. H. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. **The Bovine Practitioner Proceeding**, v.24, p. 39-43, 1991.

BROCKMAN, R. P.; LAARVELD, B. Hormonal regulation of metabolism in ruminants: a review. **Livestock Production Science**, v. 14, n. 4, p. 313–334, 1986. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0301622686900126>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

BULMAN, D. C.; LAMMING, G. E. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, n. 2, p. 447–458, 1 nov. 1978. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/54/2/447.abstract>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

BUTLER, S. T.; MARR, A. L.; PELTON, S. H.; RADCLIFF, R. P.; LUCY, M. C.; BUTLER, W. R. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. **Journal of Endocrinology**, v. 176, n. 2, p. 205–217, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12553869>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

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

BYATT, J. C.; EPPARD, P. J.; VEENHUIZEN, J. J.; CURRAN, T. L.; CURRAN, D. F.; MCGRATH, M. F.; COLLIER, R. J. Stimulation of mammatogenesis and lactogenesis by recombinant bovine placental lactogen in steroid-primed dairy heifers. **Journal of Endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 33–43, 1 jan. 1994. Disponível em: <<http://joe.endocrinology-journals.org/content/140/1/33.abstract>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 419-425, ago. 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0004->

27302002000400013>. Acesso em: 13 ago. 2018.

CHASSAGNE, M.; BARNOUIN, J.; CHACORNAC, J. P. Risk factors for stillbirth in holstein heifers under field conditions in france: A Prospective Survey. **Theriogenology**, v. 51, n. 8, p. 1477–1488, jun. 1999.

CHI, M. M.; SCHLEIN, A. L.; MOLEY, K. H. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. **Endocrinology**, v. 141, n. 12, p. 4784–4792, dez. 2000.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; FAULCONNIER, Y.; BONNET, M.; ROUEL, J.; BOCQUIER, F. Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, n. 1, p. 127–134, fev. 2000.

COLLIER, R. J. J.; BAUMAN, D. E. E.; HAYS, R. L. L. Milk production and reproductive performance of cows hormonally induced into lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 10, p. 1524–1527, 14 set. 1975. Disponível em: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(75\)84746-1/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(75)84746-1/abstract)>. Acesso em: 13 ago. 2018.

COTILLARD, A.; POITOU, C.; TORCIVIA, A.; BOUILLOT, J.-L.; DIETRICH, A.; KLOTING, N.; GREGOIRE, C.; LOLMEDE, K.; BLUHER, M.; CLEMENT, K. Adipocyte size threshold matters: link with risk of type 2 diabetes and improved insulin resistance after gastric bypass. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 8, p. E1466-70, ago. 2014.

CRESCENZO, R.; BIANCO, F.; MAZZOLI, A.; GIACCO, A.; CANCELLIERE, R.; DI FABIO, G.; ZARRELLI, A.; LIVERINI, G.; IOSSA, S. Fat quality influences the obesogenic effect of high fat diets. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9475–9491, nov. 2015.

DANDONA, P.; GHANIM, H.; CHAUDHURI, A.; DHINDSA, S.; KIM, S. S. Macronutrient Intake Induces Oxidative and Inflammatory Stress: Potential Relevance to Atherosclerosis and Insulin Resistance. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 42, n. 4, p. 245–253, abr. 2010.

DE KOSTER, J. D.; OPSOMER, G. Insulin resistance in dairy cows. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 29, n. 2, p. 299-322, 2013.

ERB, R. E.; MONK, E. L.; MOLLETT, T. A.; MALVEN, P. V.; CALLAHAN, C. J. Estrogen, Progesterone, Prolactin and Other Changes Associated with Bovine Lactation Induced with Estradiol-17beta and Progesterone. **Journal of Animal Science**, v. 42, n. 3, p. 644-654, mar. 1976.

ESPOSITO, G.; IRONS, P. C.; WEBB, E. C.; CHAPWANYA, A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 144, n. 3-4, p. 60-71, 2014.

FERNÁNDEZ-JULIÁN. Isopropanolic Cimicifuga racemosa is favorable on bone markers but neutral on an osteoblastic cell line. **Osteoporosis International**, v. 4, n. 1, p. 337-342, 2009. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2014.03.003>%5Cnpapers3://publication/doi/10.1016/j.tig.2014.03.003%5Cn<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-genom-082908-150121>%5Cn<http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nbt.1540>%5Cn<http://dx.plos.org/10.137>>.

FERREIRA, R. M. **A baixa fertilidade de vacas Holandesas (*B. taurus*) repetidoras de serviço durante o estresse térmico está relacionada à sua baixa competência oocitária.** 140 f. 2012. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M. R.; FERRAZ, M. L.; ARAUJO, A. B.; RODRIGUES, C. A.; WATANABE, Y. F.; VIREQUE, A. A.; JOAQUIM, D. C.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V.; BARUSELLI, P. S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2383-2392, maio 2011.

FERREIRA, R. M.; CHIARATTI, M. R.; MACABELLI, C. H.; RODRIGUES, C. A.; FERRAZ, M. L.; WATANABE, Y. F.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V.; BARUSELLI, P. S. The Infertility of repeat-breeder cows during summer is associated with decreased mitochondrial DNA and increased expression of mitochondrial and apoptotic genes in oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 3, p. 66, mar. 2016.

FOWLER, P. A.; FOSTER, M. A.; KNIGHT, C. H. In-vivo magnetic resonance imaging studies of mammosgenesis in non-pregnant goats treated with exogenous steroids. **Journal of Dairy Research**, v. 58, n. 2, 151-7, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1856349>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

FRANCISQUETI, F. V.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, C. R. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. **Nutrire**, p. 81–89, 2015.

FREITAS C. A.; SALES, J. N. S.; TEIXEIRA, A. A.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; RANIERI, A. L.; BARUSELLI, P. S, B. G. . R. Perda embrionária (entre 30 e 60 dias) à inseminação artificial e à transferência de embrião de vacas Holandesas de alta produção. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 24., 2010, Porto de Galinhas, PE. **Anais...** 2010. p. 393.

FREITAS, P. R. C.; COELHO, S. G.; RABELO, E.; LANA, Â. M. Q.; ARTUNDUAGA, M. A. T.; SATURNINO, H. M. Artificial induction of lactation in cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 10, p. 2268–2272, out. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982010001000024&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 24 fev. 2015.

FULKERSON, W. J. Artificial induction of lactation: A comparative study in heifers. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 31, n. 1, p. 65-72, 1978.

GARCIA, S. M.; MARINHO, L. S. R.; LUNARDELLI, P. A.; SENEDA, M. M.; MEIRELLES, F. V. Developmental block and programmed cell death in bos indicus embryos: Effects of protein supplementation source and developmental kinetics. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–16, 2015.

GILLAND, B. World population and food supply: can food production keep pace with population growth in the next half-century? **Food Policy**, v. 27, n. 1, p. 47–63, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306919202000027>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

GONG, J. G.; BAXTER, G.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. **J Reprod Fertil**, v. 110, n. 1, p. 91–97, 1997. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/cgi/content/abstract/110/1/91>>. Acesso em: 13 ago.

2018.

GONG, J. G.; LEE, W. J.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Effect of Dietary-Induced Increases in Circulating Insulin Concentrations during the Early Postpartum Period on Reproductive Function in Dairy Cows. **Reproduction**, Cambridge, UK, v. 123, n. 3, p. 419–427, mar. 2002.

GONZÁLEZ, F. D.; MUIÑO, R.; PEREIRA, V.; CAMPOS, R.; BENEDITO, J. L. Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. **Journal of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 251–255, 2011.

GRADEN, A. P.; OLDS, D.; MOCHOW, C. R.; MUTTER, L. R. Causes of fertilization failure in repeat breeding cattle. **J Dairy Sci**, v. 51, n. 5, p. 778–781, 1968. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5648809>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

GUSTAFSSON K., H. . L. Embryonic mortality in heifers after artificial insemination and embryo transfer: differences between virgin and repeat breeder heifers. **Research in Veterinary Science**, v. 39, n. 3, p. 271–274, 1985.

GUSTAFSSON, H. Characteristics of embryos from repeat breeder and virgin heifers. **Theriogenology**, v. 23, n. 3, p. 487–498, 1985. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X85900214>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

HABIB, S. S.; ASLAM, M.; SHAH, S. F. A.; NAVEED, A. K. Lipoproteína (a) está Associada com Níveis Basais de Insulina em Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 93, n. 1, 2009.

HAGE HASSAN, R.; BOURRON, O.; HAJDUCH, E. Defect of insulin signal in peripheral tissues: important role of ceramide. **World Journal of Diabetes**, v. 5, n. 3, p. 244–257, jun. 2014.

HANCOCK, J.; BRUMBY, P. J.; TURNER, C. W. Hormonal induction of lactation in identical twin dairy cattle. **New Zealand Journal of Science and Technology**, v. 36, p.

111–116, 1954.

HAYIRLI, A. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 7, p. 749–774, out. 2006.

HEUER, C.; SCHUKKEN, Y. H.; DOBBELAAR, P. Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 295–304, fev. 1999.

HOLTENIUS, P.; HOLTENIUS, K. A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 49, n. 1, p. 29, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1751-0147-49-29>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and Metabolic Disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, dez. 2006.

HOTAMISLIGIL, G. S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A.; ELLIS, R.; WHITE, M. F.; SPIEGELMAN, B. M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-Alpha-and obesity-induced insulin resistance. **Science**, New York, v. 271, n. 5249, p. 665–668, fev. 1996.

IGWEBUIKE, U. M. Trophoblast cells of ruminant placentas: a minireview. **Animal Reproduction Science**, v. 93, n. 3–4, p. 185–198, 2006.

JEWELL, T. **Artificial induction of lactation in nonbreeder dairy cows**. 2002. Dissertação (Mestrado) - Virginia Polytechnic Institute (Virginia Tech), University of Virginia, S.l. 2002. Disponível em: <<https://vtechworks.lib.vt.edu/handle/10919/33721?show=full>>. Acesso em: 14 ago. 2018.

JIANG, Z. Y.; LIN, Y. W.; CLEMONT, A.; FEENER, E. P.; HEIN, K. D.; IGARASHI, M.; YAMAUCHI, T.; WHITE, M. F.; KING, G. L. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 4, p. 447–457, ago. 1999.

KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 4, p. 473–481, ago. 2000.

KAHN, C. R. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. **Metabolism**, v. 27, 1978. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0026-0495\(78\)80007-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0026-0495(78)80007-9)>. Acesso em: 13 ago. 2018.

KENSINGER, R. S.; BAUMAN, D. E.; COLLIER, R. J. Season and treatment effects on serum prolactin and milk yield during induced lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 12, p. 1880–1888, dez. 1979. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83518-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83518-3)>. Acesso em: 13 ago. 2018.

KLOTING, N.; BLUHER, M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 15, n. 4, p. 277–287, dez. 2014.

KOSACKA, J.; KERN, M.; KLOTING, N.; PAESCHKE, S.; RUDICH, A.; HAIM, Y.; GERICKE, M.; SERKE, H.; STUMVOLL, M.; BECHMANN, I.; NOWICKI, M.; BLUHER, M. Autophagy in adipose tissue of patients with obesity and type 2 diabetes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 409, p. 21–32, jul. 2015.

KURYKIN, J.; WALDMANN, A.; TIIRATS, T.; KAART, T.; JAAKMA, Ü. Morphological quality of oocytes and blood plasma metabolites in repeat breeding and early lactation dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 253–260, 2011.

LAGO, E. P.; DA COSTA, A. P. D.; PIRES, A. V.; SUSIN, I.; DE FARIAS, V. P.; DO LAGO, L. A. Parâmetros metabólicos em vacas leiteiras durante o período de transição pós-parto. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, n. 1–2, 2004.

LARRY SMITH, K.; SCHANBACHER, F. L. Hormone induced lactation in the bovine. I. lactational performance following injections of 17 β -estradiol and progesterone. **Journal of Dairy Science**, v. 56, n. 6, p. 738–743, 14 set. 1973. Disponível em: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(73\)85243-9/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(73)85243-9/abstract)>. Acesso em: 13 ago. 2018.

LAWRENCE, M. C.; MCKERN, N. M.; WARD, C. W. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, n. 6, p. 699–705, 2007.

LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; GUAL, P.; GREMEAUX, T.; GONZALEZ, T.; BARRES, R.; TANTI, J.-F. Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. Pt 6, p. 1152–1156, dez. 2003.

LEGEZA, B.; MARCOLONGO, P.; GAMBERUCCI, A.; VARGA, V.; BANHEGYI, G.; BENEDETTI, A.; ODERMATT, A. Fructose, glucocorticoids and adipose tissue: implications for the metabolic syndrome. **Nutrients**, v. 9, n. 5, abr. 2017.

LEIVA, T.; COOKE, R. F.; ABOIN, A. C.; DRAGO, F. L.; GENNARI, R.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of excessive energy intake and supplementation with chromium propionate on insulin resistance parameters in nonlactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 2, p. 775–782, 2014..

LEIVA, T.; COOKE, R. F.; BRANDÃO, A. P.; ABOIN, A. C.; RANCHES, J.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of excessive energy intake and supplementation with chromium propionate on insulin resistance parameters, milk production, and reproductive outcomes of lactating dairy cows. **Livestock Science**, v. 180, p. 121–128, 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.08.007>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

LEIVA, T.; COOKE, R. F.; BRANDAO, A. P.; MARQUES, R. S.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of rumen-protected choline supplementation on metabolic and performance responses of transition dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 4, p. 1896–1904, abr. 2015b.

LEROY, J. L. M. R. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, v. 130, n. 4, p. 485–495, 2005.

LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P. E. J.; DE KRUIF, A. Metabolite and ionic composition of follicular

fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 201–211, 2004.

LEROY, J.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 5, p. 623–632, 2008.

MADEIRA, I. R.; CARVALHO, C. N. M.; GAZOLLA, F. M.; MATOS, H. J. de; BORGES, M. A.; BORDALLO, M. A. N. Cut-off point for Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) index established from Receiver Operating Characteristic (ROC) curve in the detection of metabolic syndrome in overweight pre-pubertal children. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 9, p. 1466–1473, 2008.

MATAMOROS, I. A.; COX, N. M.; MOORE, A. B. Effects of exogenous insulin and body condition on metabolic hormones and gonadotropin-induced follicular development in prepubertal gilts. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 5, p. 2081–2091, 1 maio 1991. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2527/1991.6952081x>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

MATIKAINEN, N.; TASKINEN, M.-R. Postprandial triglyceride-rich lipoproteins in insulin resistance and type 2 diabetes. **Future Lipidology**, v. 3, n. 5, p. 531–543, 2008. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L352646137%5Cnhttp://www.futuremedicine.com/doi/pdf/10.2217/17460875.3.5.531%5Cnhttp://dx.doi.org/10.2217/17460875.3.5.531%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=1746087>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

MELLADO, M.; ANTONIO-CHIRINO, E.; MEZA-HERRERA, C.; VELIZ, F. G.; AREVALO, J. R.; MELLADO, J.; DE SANTIAGO, A. Effect of lactation number, year, and season of initiation of lactation on milk yield of cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 9, p. 4524–30, set. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030211004632>>. Acesso em: 2 mar. 2015.

MELLADO, M.; NAZARRE, E.; OLIVARES, L.; PASTOR, F.; ESTRADA, A. Milk production and reproductive performance of cows induced into lactation and treated with bovine somatotropin. **Animal Science**, v. 82, n. 04, p. 555–559, 9 mar. 2006. Disponível

em: <http://journals.cambridge.org/abstract_S1357729806000658>. Acesso em: 2 mar. 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. Washington, D.C.: National Academic Press, 2001.

NETZER, N.; GATTERER, H.; FAULHABER, M.; BURTSCHER, M.; PRAMSOHLER, S.; PESTA, D. Hypoxia, oxidative stress and fat. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 1143–1150, jun. 2015.

OIKAWA, S.; OETZEL, G. R. Decreased Insulin Response in Dairy Cows Following a Four-Day Fast to Induce Hepatic Lipidosis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 8, p. 2999–3005, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030206725723>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

OLIVEIRA, Louise Helen de. **Associação da insulina circulante com a função ovariana e qualidade oocitária em vacas holandesas**. 2016. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

OLIVEIRA, L. H.; NASCIMENTO, A. B.; MONTEIRO, P. L. J. J.; GUARDIEIRO, M. M.; WILTBANK, M. C.; SARTORI, R. Development of insulin resistance in dairy cows by 150 days of lactation does not alter oocyte quality in smaller follicles. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 9174–9183, nov. 2016.

PANTALEON, M.; KAYE, P. L. Glucose transporters in preimplantation development. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 2, p. 77–81, maio 1998.

PLOTNICK, G. D.; CORRETTI, M. C.; VOGEL, R. A. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium—dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. **JAMA**, v. 278, n. 20, p. 1682–1686, 26 nov. 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1001/jama.1997.03550200058032>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

PINEDO, P. J.; DE VRIES, A. Effect of days to conception in the previous lactation on the risk of death and live culling around calving. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 3, p.

968–977, 2010.

PIRES, J. A. A.; PESCARA, J. B.; GRUMMER, R. R. Reduction of plasma NEFA concentration by nicotinic acid enhances the response to insulin in feed-restricted holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 10, p. 4635–4642, out. 2007.

REAVEN, G. M. Role of Insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595 LP-1607, 1 dez. 1988. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/37/12/1595.abstract>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

REAVEN, G. M. The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. **Annual Review of Nutrition**, v. 25, n. 1, p. 391–406, 12 jul. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132155>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

RODRIGUES H.; FERREIRA A. A.; MANCILHA, R. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S., C A.; AYRES, R. M. . T. Comparação entre a taxa de concepção após inseminação artificial ou a transferência de embriões em vacas Holandesas de alta produção repetidoras de serviço. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 21., 2007, Araxá, MG. **Anais...** 2007. p. 1255.

SALES, JOSÉ NÉLIO DE SOUSA. **Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus***. 2011. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SALES, J. N. S.; IGUMA, L. T.; BATISTA, R. I. T. P.; QUINTAO, C. C. R.; GAMA, M. A. S.; FREITAS, C.; PEREIRA, M. M.; CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI, P. S. Effects of a High-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *bos indicus* and *bos taurus* cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3086–3099, maio 2015.

SALILEW-WONDIM, D.; FOURNIER, E.; HOELKER, M.; SAEED-ZIDANE, M.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; NEUHOFF, C.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; RINGS, F.; GAGNÉ, D.; SIRARD, M. A.; ROBERT, C.; SHOJAEI SAADI, H. A.; GAD, A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts developed in vivo from embryos completed different stages of

development in vitro. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–31, 2015.

SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 88–97, 2008.

SASAKI, S. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. **Animal Science Journal**, v. 73, n. 6, p. 423–433, 2002.

SHAH, M.; ADAMS-HUET, B.; BRINKLEY, L.; GRUNDY, S. M.; GARG, A. Lipid, glycemic, and insulin responses to meals rich in saturated, cis-monounsaturated, and polyunsaturated (n-3 and n-6) fatty acids in subjects with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, n. 12, p. 2993–2998, dez. 2007.

SILVA, LUIZ ANTÔNIO DA. Causas de descarte de vacas da raça holandesa confinadas em uma população de 2.083 bovinos (2000–2003). **Ciência Animal Brasileira**, UFG, v. 9, n. 2, 2008. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/4239>>. Acesso em: 14 ago. 2018.

SIMPSON, R. B.; CHASE, C. C.; SPICER, L. J.; VERNON, R. K.; HAMMOND, A. C.; RAE, D. O. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, n. 2, p. 483–492, 1994. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/102/2/483.abstract>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

SINCLAIR, K. D. Declining fertility, insulin resistance and fatty acid metabolism in dairy cows: Developmental consequences for the oocyte and pre-implantation embryo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. SUPPL. 2, p. 545–558, 2010.

SKURK, T.; ALBERTI-HUBER, C.; HERDER, C.; HAUNER, H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 3, p. 1023–1033, mar. 2007.

SMITH, T. R.; HIPPEN, A. R.; BEITZ, D. C.; YOUNG, J. W. Metabolic characteristics of

induced ketosis in normal and obese dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1569–1581, ago. 1997.

STECKHAN, N.; HOHMANN, C.-D.; KESSLER, C.; DOBOS, G.; MICHALSEN, A.; CRAMER, H. Effects of different dietary approaches on inflammatory markers in patients with metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Nutrition**, Los Angeles, v. 32, n. 3, p. 338–348, mar. 2016.

SUD, S. C.; TUCKER, H. A.; MEITES, J. Estrogen-progesterone requirements for udder development in ovariectomized heifers^{1, 2}. **Journal of Dairy Science**, v. 51, n. 2, p. 210–214, 1968.

TANGVARASITTICHA, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 3, p. 456–480, abr. 2015.

TASKINEN, M.-R. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice*. **Diabetologia**, v. 46, n. 6, p. 733–749, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00125-003-1111-y>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

TUCKER, H. A. Hormones, Mammary Growth, and Lactation: A 41-Year Perspective. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 874–884, abr. 2000.

TURNER, C. W.; YAMAMOTO, H.; RUPPERT JR., H. L. The experimental induction of growth of the cow's udder and the initiation of milk secretion^{1,2}. **Journal of Dairy Science**, v. 39, n. 12, p. 1717–1729, 1 dez. 1956. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(56\)94914-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(56)94914-1)>. Acesso em: 13 ago. 2018.

YAO, L.; HERLEA-PANA, O.; HEUSER-BAKER, J.; CHEN, Y.; BARLIC-DICEN, J. Roles of the chemokine system in development of obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, article 181450, 2014.

YUSUF, M.; NAKAO, T.; RANASINGHE, R. B. K.; GAUTAM, G.; LONG, S. T.; YOSHIDA, C.; KOIKE, K.; HAYASHI, A. Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. **Theriogenology**, v. 73, p. 1220–1229, 2010.

ZHAO, F.-Q.; KEATING, A. F. Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 90, Suppl 1, p. E76-86, jun. 2007.

ANEXOS

Laboratório de Endocrinologia Animal

UNESP - Faculdade de Medicina Veterinária - Araputuba

Insulina Bovina (b-Insulina)

Ensaio Imunoquímico (ELISA)

1. Objetivo

Essa metodologia objetiva a mensuração quantitativa de Insulina bovina (b-Insulina) em plasma e soro na espécie bovina.

2. Insulina

É um hormônio proteico, com peso molecular de 5,3 kDa, produzido pelo pâncreas na forma de pré-pró-insulina que ao chegar no retículo endoplasmático é clivado e convertido em pró-insulina, e posteriormente enviada ao complexo de Golgi e armazenada em grânulos no citoplasma da célula. Durante o armazenamento a pró-insulina é convertida em insulina, composta por duas cadeias peptídicas (A e B) unidas por ligações dissulfeto das cisteínas nas posições A7 e B7 e entre as posições A20 e B19, com concomitante liberação de uma cadeia peptídica denominada peptídeo C.

A insulina é o hormônio responsável por controlar a captação, utilização e armazenamento de glicose, aminoácidos e ácidos graxos pelas células, inibindo a degradação do glicogênio, proteínas e gordura.

3. Princípio do teste

A metodologia adotada nesse teste de ELISA utiliza o sistema de amplificação biotina-estreptavidina peroxidase, sendo este aplicado a um ensaio de competição.

O hormônio presente na amostra, disputa com o hormônio biotilado os sítios de ligação do anticorpo específico (concentração constante). O complexo antígeno-anticorpo é captado em fase sólida, utilizando um anticorpo secundário previamente adsorvido à microplaca.

Após a remoção da fração livre, é inserido a peroxidase conjugada a estreptavidina, que irá ligar-se exclusivamente ao hormônio biotilado.

A enzima oxidará o substrato induzindo a formação de diferentes intensidades de cor, mensurada a 450 nm.

As densidades ópticas resultantes serão inversamente proporcionais a concentração do hormônio na amostra.

4. Metodologia

4.1-Preparo das placas (sensibilização e bloqueio)

Para sensibilização das microplacas, com 96 poços (Nunc, Maxisorp, Thermo Scientific, cod. 80040LE0910), foi utilizada IgG de cabra anti-Guinea pig (Antibodies Incorporated). A cada poço foram adicionados 100 µL de tampão carbonato 0,0522 M, pH= 9,6 contendo 0,25 µg de IgG anti-Guinea pig. Após incubação *overnight* a 4°C, as placas foram lavadas com 300 µL/poço de solução de Tween 80 0,05% por 2 vezes, utilizando lavadora de microplacas Thermo Scientific (cod. 5165000). Posteriormente, foi realizado o bloqueio dos sítios de ligação remanescentes nos poços, com a adição de 300 µL/poço de PBS-BSA 1%, pH=7,2, seguido por incubação a 37°C por 50 min, sendo então realizada nova lavagem com solução de Tween 80 0,05%.

4.2-Dosagem de Insulina

A Insulina foi quantificada por ELISA utilizando o sistema de amplificação biotina-estreptavidina peroxidase em um ensaio competitivo. Foram adicionados 100 µL/poço do antisoro anti-b-Insulina produzido em Guinea Pig (*Cavia porcellus*) na diluição 1:26.000, seguido por uma incubação de 24 horas a 4°C. Após a fixação do anticorpo específico ao anticorpo de captura, foram realizadas duas lavagens com Tween 80 0,05% e adicionados 100 µL dos padrões e amostras e a microplaca foi

Quantificação de b-Insulina por ELISA

Laboratório de Endocrinologia Animal

UNESP - Faculdade de Medicina Veterinária - Araputuba

Insulina Bovina (b-Insulina)

Ensaio Imunoquímico (ELISA)

incubada novamente, sob agitação constante, por 24 horas a 4°C.

Ao término da incubação as microplacas foram lavadas por duas vezes com 300 µL/poço de Tween 80 0,05% e então adicionou-se 100 µL/poço da Insulina bovina biotinizada (0,2 ng/poço) e realizou-se nova incubação de 24 horas a 4°C. Após a captação do antígeno biotilado pelos sítios de anticorpos remanescentes, foram realizadas duas lavagens com Tween 80 0,05%, sendo adicionados 2,5 mU de peroxidase/100 µL/poço (Streptavidin-POD conjugate 500 U/mL, Roche) e incubadas por 30 minutos à 4°C.

As microplacas foram lavadas novamente com Tween 80 0,05%, e então foram adicionados 100 µL/poço de substrato composto por 2 mM 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), 100 mM de ácido cítrico, 10,63 mM de peróxido de ureia, 126,8 mM de Na₂HPO₄ e 4% de DMSO.

As microplacas foram mantidas em estufa a 37°C, protegidas da luz, por 40 minutos e a reação de oxidação do substrato foi interrompida pela adição de 30 µL/poço de ácido sulfúrico 2M. A determinação da densidade óptica foi imediatamente realizada, em leitora de microplacas (Sunrise, Tecan, cod. 16039400), utilizando o comprimento de onda de 450 nm.

Para o cálculo das doses, as concentrações dos padrões foram convertidas em log de base 10 (eixo x), e as densidades ópticas, após o cálculo de porcentagem da ligação máxima (% B/B₀) foram convertidos com a função *logit*. A determinação das concentrações plasmáticas de insulina foi realizada pela interpolação com a curva padrão, utilizando regressão linear.

5. Curva Padrão

A curva padrão foi elaborada utilizando os padrões com as seguintes concentrações: 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µUI/mL (b-Insulina, Sigma cód. I6634). Apenas curvas com r² superiores a 0,9 foram utilizadas, quando esse valor não era atingido o ensaio foi refeito.

Abaixo segue exemplo da curva padrão, sendo as concentrações dos padrões convertidas log de base 10 (eixo x) e as densidades ópticas em *logit* (eixo y).

Tabela 1. Valores médios das densidades ópticas.

STD (µg/mL)	D.O (450 nm)	DP
B ₀	0.814	0.027
3.125	0.674	0.0005
6.25	0.532	0.001
12.5	0.515	0.0065
25	0.421	0.003
50	0.331	0.0075
100	0.261	0.022

6. Limite de quantificação

O limite de quantificação inferior foi estabelecido com base nos resultados das doses calculadas da curva padrão após aplicação da regressão linear. Foi estabelecido como limite inferior 6.25 µUI/mL de b-Insulina.

Quantificação de b-Insulina por ELISA

Laboratório de Endocrinologia Animal

UNESP - Faculdade de Medicina Veterinária - Araçatuba

**Insulina Bovina
(b-Insulina)****Ensaio Imunoquímico (ELISA)**

Tabela 2. Avaliação da precisão do ensaio.

Controles	Insulina (μ U/mL)	CV (%)
Intra-ensaio		
Alto	75.39	20.31
Baixo	26.95	25.59
Inter-ensaio		
Alto		15.27
Baixo		20.34

9 REALIZAÇÃO:**Laboratório de endocrinologia Animal****Universidade Estadual Paulista "Júlio de****Mesquita Filho"****Faculdade de Medicina Veterinária, Campus****Araçatuba.**Supervisor: Prof. Adj. Guilherme de Paula
Nogueira. e-mail: gpn@fmva.unesp.brResponsável Técnico: Dr. Marcos Antonio Maioli.
e-mail: maioli_marcos@hotmail.com