**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Associação da insulina circulante com a função ovariana e
qualidade oocitária em vacas holandesas**

Louise Helen de Oliveira

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba
2016**

Louise Helen de Oliveira
Médica Veterinária

**Associação da insulina circulante com a função ovariana e qualidade oocitária
em vacas holandesas**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ROBERTO SARTORI FILHO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Oliveira, Louise Helen de

Associação da insulina circulante com a função ovariana e qualidade oocitária em vacas holandesas / Louise Helen de Oliveira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

82 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Ovum pick-up 2. Teste de tolerância à glicose 3. Propilenoglicol 4. Ovário 5. Bovino leiteiro I. Título

CDD 636.214
O48a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Ao meu grandioso Deus, por seu infinito amor, graça e misericórdia,

*Aos meus maravilhosos pais, Juraci e Luix pelo amor incondicional,
A minha irmã Jaqueline e meu cunhado Bruno, por todo incentivo e
suporte,*

*Ao meu noivo Fabrício Barbosa, por seu amor e companheirismo
diário*

Com todo amor e eterna gratidão,

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Roberto Sartori Filho, pela oportunidade de executar este trabalho, por estar sempre presente em todos os momentos e pelos ensinamentos pessoais e profissionais que serão levados por toda vida.

Ao professor Dr. Milo Wiltbank por sua valiosa contribuição em todas as etapas deste estudo.

À toda equipe do LRA: Camila Spies, Pedro Leopoldo, Alexandre Prata, Leonardo Melo, Jéssica Drum, Aníbal Nascimento, Michele Bastos, Fernanda Zinsly, Guilherme Pontes, Monique Guardieiro, Amanda Lemes, Fernanda Silva, Juliana Borges, Jobson Cajueiro e José Carvalho. Minha gratidão pela amizade, por todos os momentos vividos, experiências e contribuição direta para deste trabalho.

Aos estagiários, hoje todos graduados: Roberta Valle, Rafael Souza, Tatiana Heller, Rilly Antretta, Renata Freitas, Helen Krystine, Beno Santana, Felipe Souza, Tony Bruinje, Bruno Gonzales, Rafaela Hayashi, Ueliton Viegas pelo importante auxílio na condução dos experimentos.

Ao Jorge Gonzales e a todos os funcionários da fazenda São Jorge, por toda a infraestrutura e apoio fundamentais para execução dos experimentos.

Aos prof. Carla Bittar e Guilherme Nogueira pelo apoio nos ensaios laboratoriais. À professora Paula Papa e Aurea Canavessi por todo suporte. Aos professores, funcionários e colegas da ESALQ/USP que, direta ou indiretamente, contribuíram para conclusão deste estudo.

Às agências de fomento FAPESP (2011/07243-0 e 2012/50752-6), CAPES e CNPQ, pelos recursos financeiros concedidos.

Às minhas amigas Kátia Quites e Dayana Luiza, que mesmo à distância, se fazem presentes no meu dia-a-dia. Ao Ronaldo Cunha, pela amizade, apoio e todo suporte desde a minha formação.

Aos meus queridos professores, Sandra Gesteira, Antônio Último, Lívio Molina e Paulo Marques pela amizade e incentivo.

À Tarcila, Ricardo, Veridiana e demais amigos, bem como os familiares que fizeram parte dessa trajetória.

“Por isso não temas, porque estou contigo; não te assustes, porque sou o teu Deus; Eu te fortaleço, ajudo e sustento com a mão direita da minha justiça”

Isaias 41.10

SUMÁRIO

	RESUMO	11
	ABSTRACT	13
1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Objetivos	18
	Referências.....	18
2	SUPERESTIMULAÇÃO FOLICULAR PREVIAMENTE À OVUM PICK-UP NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES EM VACAS HOLANDESAS	23
	Resumo	23
	Abstract.....	23
2.1	Introdução.....	24
2.2	Materiais e Métodos	25
2.2.1	Animais e local	25
2.2.2	Delineamento experimental e tratamentos.....	26
2.2.3	Ovum pick-up (OPU) e produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	26
2.2.4	Análise estatística.....	27
2.3	Resultados e Discussão.....	28
2.4	Conclusão	31
	Referências.....	31
3	RESISTÊNCIA À INSULINA EM VACAS LEITEIRAS AOS 150 DIAS DE LACTAÇÃO NÃO ALTERA A QUALIDADE DO OÓCITOS DE FOLÍCULOS PEQUENOS.....	35
	Resumo	35
	Abstract	35
3.1	Introdução	36
3.2	Materiais e Métodos.....	37
3.2.1	Animais e delineamento experimental.....	38
3.2.2	<i>Ovum pick-up</i> (OPU).....	39
3.2.3	TTG e análises laboratoriais.....	40
3.2.4	Cálculos e Análise Estatística	41

3.3	Resultados	42
3.3.1	ECC e produção de leite	42
3.3.2	TTG.....	42
3.3.3	Qualidade do oócito	46
3.4	Discussão.....	47
3.5	Conclusão.....	52
	Referências.....	53
4	EFEITO DO AUMENTO DE INSULINA CIRCULANTE SOBRE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E LUTEAL EM VACAS HOLANDESAS.....	58
	Resumo.....	58
	Abstract.....	58
4.1	Introdução.....	59
4.2	Materiais e Métodos.....	60
4.2.1	Animais e manejo alimentar.....	61
4.2.2	Tratamentos e avaliação ultrassonográfica.....	61
4.2.3	Colheitas de sangue e análises laboratoriais.....	62
4.2.4	Análise estatística	64
4.3	Resultados e discussão.....	65
4.3.1	Concentrações circulantes de insulina e glicose.....	65
4.3.2	Dinâmica folicular	68
4.3.3	Dinâmica luteal e concentrações circulantes de P4.....	71
4.4	Conclusão.....	75
	Referências.....	75
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
5.1	Referências.....	81

RESUMO

Associação da insulina circulante com a função ovariana e qualidade oocitária em vacas holandesas

O objetivo do primeiro estudo foi avaliar a produção in vitro de embriões (PIVE) em vacas holandesas não lactantes submetidas a aspiração oocitária (OPU) posteriormente ao protocolo de superestimulação folicular similar ao descrito por Nivet et al. (2012) em comparação à realização da OPU em dia aleatório do ciclo estral. Para tal, vacas holandesas não lactantes e não gestantes foram distribuídas aleatoriamente em delineamento tipo *crossover* em Controle (n = 35), em que as vacas não foram tratadas com FSH, mas submetidas a uma sessão de aspiração em dia aleatório do ciclo estral; ou p-FSH (n = 35), em que, 36 horas após a OPU para sincronização da onda folicular, as vacas foram tratadas com p-FSH por 3 dias e 44 horas após, submetidas a sessões de OPU. O número total de complexos cumulus-oócito (CCO) recuperados e o número de oócitos viáveis foram semelhantes entre os grupos controle e p-FSH. Além disso, não houve aumento na proporção de CCO viáveis (CCO viáveis / CCO total recuperado). Da mesma forma, não se detectaram diferenças no número de embriões / sessão de OPU e taxa de blastocistos. O protocolo de superestimulação folicular não melhorou a PIVE em vacas holandesas não lactantes. O experimento 2 testou a hipótese de que vacas leiteiras de alta produção se tornam cada vez mais resistentes à insulina com o avançar da lactação, e conseqüentemente, a qualidade do oócito é comprometida. Foram utilizadas vacas holandesas em 50 ($51,5 \pm 3,7$; n = 30), 100 ($102,3 \pm 9,4$; n = 30) e 150 ($154,5 \pm 18,9$; n = 30) dias em lactação (DEL). Durante o teste de tolerância à glicose (TTG), não houve diferença entre grupos para qualquer variável relacionada à glicose circulante. No entanto, medidas de insulina circulante foram diferentes em vacas aos 150 DEL em comparação com 50 ou 100 DEL, tais como: maior insulina basal, pico, Δ máx de insulina e AUC 5-60. Porém, não houve diferença entre os grupos para o número ou percentagem de oócitos viáveis. Assim, as vacas desenvolveram resistência à insulina com o aumento do DEL. No entanto, o aumento da resistência à insulina não foi associado com alteração detectável na qualidade dos oócitos aspirados de folículos pequenos e médios. O experimento 3 foi para avaliar se o aumento de insulina circulante durante os períodos de pré e pós desvio folicular aumenta o desenvolvimento inicial e final, do folículo, bem como do corpo lúteo (CL). Além disso, por induzir a ovulação de um folículo maior, o CL resultante de vacas com alta insulina circulante também é maior e mais esteroideogênico, refletindo em maiores concentrações circulantes de progesterona (P4). O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino em arranjo fatorial 2x2, em quatro grupos experimentais: 1) CC = água pré e pós desvio folicular (n = 16); 2) CP = água e propilenoglicol (PPG) pré e pós desvio folicular, respectivamente (n = 16); 3) PC = PPG e água pré e pós desvio folicular, respectivamente (n = 16) e 4) PP = PPG pré e pós desvio folicular (n = 16). O aumento agudo e transitório, durante os períodos de pré e pós desvio não aumentou o desenvolvimento folicular, luteal e concentrações plasmáticas de P4.

Palavras-chave: Ovum pick-up; Teste de tolerância à glicose; Propilenoglicol; Ovário; Bovino leiteiro

ABSTRACT

Influence of circulating insulin on ovarian function and oocyte quality in dairy cows

The aim of the first study was to evaluate the in vitro embryo production (IVEP) in nonlactating Holstein cows subjected to ovum pick-up (OPU) after ovarian superstimulation with a protocol similar to that described by Nivet et al. (2012) in comparison with OPU at a random day of the estrous cycle. Nonlactating Holstein cows were randomly assigned in a crossover design to: Control (n = 35) in which cows were not treated with p-FSH, but subjected to OPU at a random day of the estrous cycle; or p-FSH (n = 35), in which, 36 hours after OPU to synchronize follicle wave, the cows were treated with p-FSH for 3 days and 44 hours later, subjected to OPU sessions. The total number of cumulus-oocyte complex (COC) recovered and the number of viable oocytes were similar between control and p-FSH groups. In addition, there was no increase in the proportion of viable COC (viable COC / overall COC recovered). Likewise, we detected no differences in the number of embryos / OPU session and blastocyst rate. Follicle superstimulation protocol with p-FSH did not improve IVEP in nonlactating Holstein cows. Experiment 2 tested the hypothesis that high-producing dairy cows become increasingly resistant to insulin with advancing lactation, and consequently oocyte quality is compromised. We used Holstein cows at 50 (51.5 ± 3.7 ; n = 30), 100 (102.3 ± 9.4 ; n = 30) and 150 (154.5 ± 18.9) days in milk (DIM). During the glucose tolerance test (GTT), there was no difference between groups for any variable related to circulating glucose. However, circulating insulin measurements such as basal insulin, peak insulin, Δ max and AUC 5-60 were higher for cows at 150 DIM. Nevertheless, there was no difference between groups for the number or percentage of viable oocytes. Therefore, although cows developed insulin resistance with increasing DIM, this has not been associated with detectable change in the quality of oocytes aspirated from small and medium follicles. The third experiment assessed whether the increase in circulating insulin during periods of pre- and post-follicle deviation increases the initial and final follicle size and corpus luteum (CL) volume. Moreover, by inducing ovulation of greater follicles, resulting in greater CL, cows with high circulating insulin also have higher circulating progesterone (P4). The experimental design was a Latin square in a 2x2 factorial arrangement in four groups: 1) CC = water pre and post follicle deviation (n = 16); 2) CP = water pre and propylene glycol (PPG) post follicle deviation (n = 16); 3) PC = PPG and water pre and post follicle deviation, respectively (n = 16), 4) PP = PPG pre and post follicle deviation (n = 16). Acute and transient circulating insulin increase during periods of pre and post follicle deviation has not affected follicle development, luteal volume or plasma concentrations of P4.

Keywords: Ovum pick-up; Glucose tolerance test; Propylene Glycol; Ovary; Dairy cattle

1 INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva é de fundamental importância econômica no que diz respeito à produção de leite (STEVENSON et al., 2008). Porém, nos últimos anos, tem havido um declínio na fertilidade de vacas leiteiras, especialmente daquelas com alto mérito genético para a produção de leite. Entre os fatores relacionados à diminuição da eficiência reprodutiva estão: infecções uterinas pós-parto, perdas embrionárias precoces, condições de estresse calórico e condições anovulatórias (WALSH, WILLIAMS E EVANS, 2011).

Vacas de alta produção comumente apresentam balanço energético negativo (BEN), condição esta que afeta diretamente a fertilidade (BUTLER et al., 2003). As vacas com BEN apresentam diminuição do fluxo de nutrientes necessários para a ciclicidade reprodutiva (LEROY et al., 2008). Desta forma, ocorre redução na frequência de pulsos de hormônio luteinizante (LH), diminuição das concentrações séricas de glicose, insulina, fator de crescimento semelhante a insulina do Tipo I (IGF-I), redução na produção de estradiol (E2) no folículo dominante (FD) com consequente diminuição nos índices de ovulação (BUTLER, 2000).

Nos últimos anos, tendo em vista a relação direta entre o aumento da produção de leite por vaca e a diminuição da fertilidade, buscou-se, através do uso de hormônios exógenos, estabelecer protocolos que aumentem os índices reprodutivos de vacas leiteiras de alta produção (VASCONCELOS et al., 1999). Alternativas como a transferência de embriões (TE) também têm sido utilizadas, já que animais submetidos ao estresse térmico ou ao alto metabolismo hepático de hormônios esteroides ovulam ovócitos com baixa qualidade (SARTORI et al., 2006).

Além da abordagem hormonal utilizando protocolos de IATF para aumentar os índices de concepção e de prenhez por inseminação, muitos pesquisadores têm direcionado especial atenção às relações diretas e indiretas existentes entre a nutrição e a reprodução. Sabe-se que alterações metabólicas podem influenciar de maneira significativa o desempenho reprodutivo (BUTLER, 1998; WEBB et al., 1999; LUCY, 2001). Conforme citado anteriormente, logo após o parto, durante o período de BEN, além da diminuição do LH, que afeta diretamente a fertilidade, ocorre grande mobilização de reservas corporais do tecido adiposo e formação de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no fígado (CHILLIARD; BOCQUIER; DOREAU,

1998). Quando a capacidade hepática de oxidar AGNE é suprimida, ocorre a formação de corpos cetônicos como o betahidroxibutirato (BHB; SMITH et al., 1997).

A insulina reduz a produção de AGNE e, conseqüentemente, de BHB pelo fígado, sendo de grande importância para reprodução. Além de anticetogênica, a insulina é responsável por estimular o transporte de glicose para o interior das células por meio de proteínas da membrana plasmática. Desta forma, assim como a glicose, a insulina também exerce papel essencial no metabolismo energético celular (LAWRENCE; MCKERN; WARD, 2007). A insulina ainda estimula a lipogênese, inibe a lipólise e aumenta o uso de corpos cetônicos em tecidos periféricos (BROCKMAN; LAARVELD, 1986). Altas concentrações de insulina no pós-parto antecipam a primeira ovulação de vacas leiteiras de alta produção (BEAM; BUTLER, 1998). Sabe-se ainda que a insulina estimula a proliferação in vitro das células da granulosa (HERNANDEZ et al., 1988; ALVAREZ et al., 2000; SPICER; CHAMBERLAIN; MACIEL, 2002) e da teca (SPICER; ALPIZAR; ECHTERNKAMP, 1993; ALVAREZ et al., 2000) e atua em folículos e CL aumentando as concentrações periféricas de P4 (LUCY et al., 1993). A administração de insulina aumenta os níveis de IGF-I intrafolicular e periférico em vacas (GONG et al., 1997). Aumento no tamanho dos folículos (SIMPSON et al., 1994) e taxa de ovulação (COX et al., 1987) tem sido reportado em animais tratados com insulina. A insulina causa recrutamento de mais folículos responsivos a gonadotrofinas (COX et al., 1987) e reduz a atresia de folículos (MATAMOROS; COX; MOORE, 1991). SELVARAJU et al. (2003) observaram aumento da concentração de P4 após ovulação em cabras pré-tratadas com insulina. No entanto, os mecanismos pelos quais a insulina atua aumentando a concentração plasmática de P4 pós-ovulação em bovinos não estão totalmente elucidados.

Ao contrário de vacas magras, aquelas com excessivo escore de condição corporal (ECC) próximo ao parto apresentam alta mobilização de AGNE e, com isso, tornam-se hiperinsulinêmicas e resistentes à ação da insulina. Isto ocorre devido ao acúmulo de gordura em tecidos e ao excessivo depósito de gordura visceral, levando o animal a desordens como a síndrome do fígado gorduroso, cetose, subfertilidade ou mesmo à infertilidade (SINCLAIR, 2010). A insulina quando em excesso, pode reduzir a qualidade ovocitária (GONG et al., 2002). Ou seja, apesar de seus aspectos positivos importantes, o desequilíbrio no fornecimento de dietas muito insulínogênicas pode interferir direta ou indiretamente na fertilidade.

A resistência à insulina promove diminuição na qualidade ovocitária em ratas e em mulheres (JUNGHEIM; MOLEY, 2008) e no desenvolvimento embrionário pré-implantacional manifestado por altos índices de morte celular apoptótica em ratas (PINTO; SCHLEIN; MOLEY, 2002). Estudos em humanos, ratos e em ruminantes jovens ou adultos indicaram baixa responsividade dos ruminantes à insulina em tecidos periféricos. Apesar da escassez de dados relativos à resistência à insulina em bovinos, os mecanismos de ação da insulina em ruminantes são semelhantes aos de outras espécies (SASAKI, 2002), mediados principalmente por diferenças na cascata de receptores da insulina, reduzindo a fosforilação dos substratos dos receptores da insulina 1 (IRS1) e induzindo a uma reduzida atividade do fosfoinositídeo 3-kinase (SALTIEL; KAHN, 2001).

Potencialmente, vacas em estágio avançado de lactação também podem sofrer os efeitos negativos da resistência à insulina por passarem por um longo período de alta ingestão alimentar antes de conseguirem conceber, tornando-se em seguida, repetidoras de serviço. Estudos também constataram queda na qualidade de embriões produzidos *in vivo* (BASTOS et al., 2009) ou *in vitro* (SALES et al., 2015), após um longo período (>5 a 8 semanas) sob alta ingestão de matéria seca/energia. Em praticamente todos os casos, os animais apresentavam hiperinsulinemia. Um dos primeiros estudos a relatar que a hiperinsulinemia em vacas está associada à redução na qualidade ovocitária foi conduzido por ADAMIAK et al. (2005). No referido estudo, foram avaliados os efeitos da condição corporal baixa ou alta no início do experimento e da dieta com concentração de energia baixa ou moderadamente alta. A dieta com alto nível de energia melhorou o desenvolvimento embrionário de animais que iniciaram o estudo em condição corporal baixa, mas, por outro lado, reduziu o desenvolvimento dos embriões de animais que iniciaram a avaliação com condição corporal alta.

Para a realização de estudos que avaliem a qualidade do oócito, assim como a produção *in vitro* de embriões (PIVE), é fundamental se utilizar protocolos de superestimulação e *ovum pick-up* (OPU) que maximizem estas medidas. Resultados positivos de PIVE foram observados quando novilhas holandesas, após ter o ciclo estral sincronizado, foram submetidas a seis doses de FSH com *coasting* de 48 horas (tempo entre o último FSH e a OPU), bem como um tratamento de LH 6 horas antes da OPU (BLONDIN et al., 2002). Os efeitos positivos da superovulação com FSH estão associados ao aumento do diâmetro folicular e ao ambiente ideal em que

o oócitos adquire competência de desenvolvimento adequado (BLONDIN et al., 2002). Além disso, o *coasting* é considerado de extrema importância para o aumento das taxas de blastocisto (NIVET et al., 2012). No entanto, outros autores relataram menor ou nenhum efeito da sincronização de onda de crescimento ou estágio de desenvolvimento folicular na PIVE em novilhas de corte ou leite, *Bos taurus*, *Bos indicus* ou cruzadas (GIMENES et al., 2015; RAMOS et al., 2010). Assim, o estudo apresentado no primeiro capítulo foi conduzido para definir qual melhor estratégia para colheita de oócitos, que posteriormente foi utilizada no estudo seguinte, apresentado no capítulo 2.

1.1 Objetivos:

Testar as hipóteses de que:

1.1.1 A produção *in vitro* de embriões em vacas holandesas não lactantes submetidas à OPU, posteriormente ao protocolo de superestimulação folicular similar ao descrito por NIVET et al. (2012) é maior em comparação com a realização da OPU em dia aleatório do ciclo estral;

1.1.2 Vacas leiteiras de alta produção se tornam cada vez mais resistentes à insulina com o avançar da lactação, e conseqüentemente, a qualidade do oócito é comprometida;

1.1.3 O aumento de insulina circulante durante os períodos de pré e pós desvio folicular aumenta o desenvolvimento inicial e final, do folículo, bem como do corpo lúteo (CL). E, por induzir a ovulação de um folículo maior, o CL resultante de vacas com alta insulina circulante também será maior e mais esteroideogênico, refletindo em maiores concentrações circulantes de progesterona (P4).

Referências

ADAMIAK, S.J.; MACKIE, K.; WATT, R.G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Impact of nutrition on oocyte quality: Cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 73, p. 918-926, 2005.

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**, Champaign, v. 78, p. 1291-302, 2000.

BASTOS, M.R.; RAMOS, A.F.; DRIESSEN, K.; MARTINS, A.C.; RUMPF R.; SARTORI, R. Influence of high dry matter intake on the superovulatory response of crossbred cows. **Ciência Animal Brasileira**, São Paulo, v. 10, p. 1066-1073, 2009.

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**, Champaign, v. 81, p. 121-131, 1998.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M.A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine cytes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, p. 38-43, 2002.

BROCKMAN, R.P.; LAARVELD, B. Hormonal-regulation of metabolism in ruminants-A review. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 14, p. 313-334, 1986.

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**, London, v. 176, p. 205-217, 2003.

BUTLER, W.R. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, p. 2533-2539, 1998.

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

CHILLIARD, Y.; BOCQUIER, F.; DOREAU, M. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 38, p. 131-152, 1998.

COX, N.M.; STUART, M.J.; ALTHEN, T.G.; BENNETT, W.A.; MILLER, H.W. Enhancement of ovulation rate in gilts by increasing dietary energy and administering insulin during follicular growth. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 64, p. 507-516, 1987.

GIMENES, L.U., FERRAZ, M.L., FANTINATO-NETO, P., CHIARATTI, M.R., MESQUITA, L.G., SA FILHO, M.F., MEIRELLES, F.V., TRINCA, L.A., RENNO, F.P., WATANABE, Y.F., BARUSELLI, P.S. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect in vitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. **Theriogenology**, Stoneham, 83, 385-393, 2015.

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. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 110, p. 91-97, 1997.

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, v. 123, p. 419-427, 2002.

HERNANDEZ, E.R.; RESNICK, C.E.; HOLTZCLAW, W.D.; PAYNE, D.W.; ADASHI, E.Y. Insulin as a regulator of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells: cellular mechanism(s) underlying physiological and pharmacological hormonal actions. **Endocrinology**, Baltimore, v. 122, p. 2034-2043, 1988.

JUNGHEIM, E.S.; MOLEY, K.H. The impact of type 1 and type 2 diabetes mellitus on the oocyte and the preimplantation embryo. **Seminars in Reproductive Medicine**, New York, v. 26, p. 186-195, 2008.

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**, London, v. 17, p. 699-705, 2007.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; VAN KNEGSEL, A.T.M.; GARCIA-ISPIERTO, I.; BOLS, P.E.J. Nutrient prioritization in dairy cows early postpartum: Mismatch between metabolism and fertility? **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, p. 96-103, 2008.

LUCY, M.C.; ADSA Foundation Scholar Award - Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 1277-1293, 2001.

LUCY, M.C.; Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (sometribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 1014-27, 1993.

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 prepuberal gilts. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, p. 2081-2091, 1991.

NIVET, A-L.; BUNEL, A.; LABRECQUE, R.; BELANGER, J.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M-A. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. **Reproduction**, Cambridge, v. 143, p. 165-171, 2012.

PINTO, A.B.; SCHLEIN, A.L.; MOLEY, K.H. Preimplantation exposure to high insulin-like growth factor I concentrations results in increased resorption rates in vivo. **Human Reproduction**, Oxford, v. 17, p. 457-462, 2002.

RAMOS, A.F.; RUMPF, R.; CAMARA, J.U.; MOLLO, M.R.; PIVATO, I.; MARQUES JR, A.P.; SARTORI, R. Effect of follicular wave synchronization on in vitro embryo production in heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 117, p. 201-207, Feb 2010.

SALES, J.N.S.; IGUMA, L.T.; BATISTA, R.I.T.P.; QUINTÃO, 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**, Champaign, v. 98, p. 3086-3099, 2015.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, London, v. 414, p. 799-806, 2001.

SARTORI, R.; GUMEN, A.; GUENTHER, J.N.; SOUZA, A.H.; CARAVIELLO, D.Z.; WILTBANK, M.C. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 1311-1321, 2006.

SASAKI, S.I. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. **Animal Science Journal**, Champaign, v. 73, p. 423-433, 2002.

SELVARAJU, S.; AGARWAL, S.K.; KARCHE, S.D.; MAJUMDAR, A.C. Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats treated with insulin. **Theriogenology**, Stoneham, v. 59, p. 1459-68, 2003.

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**, Cambridge, v. 102, p. 483-492, 1994.

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**, Porto Alegre, v. 38, p. s545-s557, 2010.

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**, Champaign, v. 80, p. 1569-1581, 1997.

SPICER, L.J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S.E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, p. 1232-1241, 1993.

SPICER, L.J.; CHAMBERLAIN, C.S.; MACIEL, S.M. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 22, p. 237-54, 2002.

STEVENSON, J.L.; DALTON, J.C.; SANTOS, J.E.P.; SARTORI, R.; AHMADZADEH, A.; CHEBEL, R.C. Effect of synchronization protocols on follicular development and estradiol and progesterone concentrations of dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, p. 3045-3056, 2008.

VASCONCELOS, J.L.M.; SILCOX, R.W.; ROSA, G.J.M.; PURSLEY, J.R.; WILTBANK, M.C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, p. 1067-1078, 1999.

WEBB, R.; CAMPBELL, B.K.; GARVERICK, H.A.; GONG, J.G.; GUTIERREZ, C. G.; ARMSTRONG, D.G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v 54, p. 33-48, 1999

WALSH, S.W.; WILLIAMS, E.J.; EVANS, A.C.O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 123, p. 127-138, 2011.

2 SUPERESTIMULAÇÃO FOLICULAR PREVIAMENTE À “OVUM PICK-UP” NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM VACAS HOLANDESAS

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a produção *in vitro* de embriões (PIVE) em vacas holandesas não lactantes tratadas com protocolo similar ao descrito por NIVET et al. (2012) em comparação à realização da OPU em um dia aleatório do ciclo estral. As vacas foram aleatoriamente distribuídas em delineamento *crossover* nos seguintes grupos experimentais: Controle (n = 35), em que as vacas não foram tratadas com FSH, mas submetidas a uma sessão de aspiração em dia aleatório do ciclo estral; ou p-FSH (n = 35), em que, 36 horas após a OPU para sincronização da onda de crescimento folicular, as vacas foram tratadas com p-FSH (Folltropin-V®, Bioniche Saúde Animal, Ontário, Canadá) e posteriormente submetidas a sessões de OPU. No grupo p-FSH, em um dia aleatório do ciclo estral, todos os folículos ≥ 7 mm de diâmetro foram aspirados para a sincronização da emergência da onda de crescimento folicular e as vacas receberam um implante auricular de norgestomet (Crestar®, MSD, São Paulo, Brasil). Trinta e seis horas depois, iniciaram-se os tratamentos com p-FSH, que consistiu em 240 mg i.m. que foi administrado em seis doses de 40 mg cada, com intervalo de 12 horas. A OPU foi realizada 44 horas após a última aplicação de p-FSH (*coasting*), quando o implante foi removido. Todos os folículos maiores do que 2,0 mm foram aspirados e a PIVE foi realizada. A taxa de blastocistos foi avaliada no sétimo dia de cultivo de embriões. Os dados contínuos foram analisados por meio dos procedimentos MIXED e os dados binomiais foram analisados pelo procedimento GLIMMIX do SAS. O número total de complexos cumulus-oócito (CCO) recuperados e o número de oócitos viáveis foram semelhantes ($P > 0,05$) entre os grupos controle e p-FSH. Além disso, não houve aumento ($P > 0,05$) na proporção de COC viáveis (COC viáveis / COC total recuperado). Não detectou-se diferença ($P > 0,05$) no número de embriões / sessão de OPU e taxa de blastocistos. O protocolo de superestimulação folicular com p-FSH não aumentou a PIVE em vacas holandesas não lactantes.

Palavras-chave: Bovinos; FSH; Aspiração folicular; Embrião

Abstract

The objective of the present study was to evaluate IVP of embryos in nonlactating Holstein cows treated with a very similar protocol as described by Nivet et al. (2012) in comparison to performing OPU at a random day of the estrous cycle. The cows were randomly assigned in a crossover design to the following experimental groups: Control (n = 35), in which cows were not treated with FSH and were subjected to an OPU session at a random day of the estrous cycle; or p-FSH (n = 35), in which, 36 h after OPU for follicle wave synchronization, cows were treated with p-FSH (Folltropin-V®, Bioniche Animal Health, Ontario, Canada) and were subjected to OPU sessions. In the p-FSH group, at a random day of the estrous cycle, all ovarian follicles ≥ 7 mm in diameter were aspirated for synchronization of follicle wave emergence and the cows received a norgestomet ear implant (Crestar®,

MSD, São Paulo, Brazil). Thirty-six h later, the treatment with p-FSH, 240 mg, i.m. was started, which was administered in six doses of 40 mg each 12 h apart. The OPU was performed 44 hours after the last application of p-FSH (coasting), when the implant was removed. All follicles greater than 2.0 mm were aspirated by ultrasound and The IVP (including the OPU sessions, *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, and *in vitro* culture) was performed using similar techniques to those described by Monteiro Jr et al. (2015). Blastocyst rate was evaluated on the seventh day of embryo culture. The continuous data were analyzed by using the Mixed procedure of SAS), and binomial data were analyzed by the Glimmix procedure of SAS. The total number of cumulus-oocyte complex (COC) recovered and number of viable oocytes were similar ($P > 0.05$) between p-FSH and Control groups. Additionally, there was no increase ($P > 0.05$) in the proportion of viable COC (viable COC / total COC recovered). We were unable to detect any differences ($P > 0.05$) in the number of embryo / cow / OPU session, as well as blastocyst rate. Ovarian follicle stimulation protocol with p-FSH did not improve IVP in nonlactating Holstein cows.

Keywords: Bovine; FSH; Follicular aspiration; Embryo

2.1 Introdução

A transferência de embriões (TE) é comumente utilizada como ferramenta para o melhoramento genético e para o aumento da eficiência reprodutiva do rebanho (DEMETRIO et al., 2006; STEWART et al., 2011). A produção de embriões por ovulação múltipla e TE (MOET) é amplamente utilizada em todo o mundo, mas a variabilidade na resposta aos tratamentos superestimulatórios continua a ser uma limitação importante (GALLI et al., 2003). Outra biotécnica alternativa para a produção de embriões é a produção *in vitro* de embriões (PIVE) (PONTES et al., 2009). Além da produção de mais embriões em um período de tempo mais curto, a PIVE também permite a utilização de sêmen sexado sem comprometer substancialmente a produção de embrião (ZHANG; LU; SEIDEL, 2003; CARVALHO et al., 2010). No entanto, a PIVE apresenta baixa eficiência em vacas leiteiras *Bos taurus* (PONTES et al., 2010). Desta forma, especialmente no Brasil, esta biotécnica tem sido amplamente utilizada em bovinos de corte *Bos indicus*, que apresentam maior população folicular comparado ao *Bos taurus* (SARTORI et al., 2010).

O sucesso na implementação do programa da PIVE não depende exclusivamente do grupo genético, mas também de outros fatores importantes como a pressão de vácuo e tipo agulha utilizado na punção folicular (OPU), bem como do número de oócitos (BOLS et al., 1997; WARD et al., 2000), fase folicular e folículo de

tamanho ideal para a OPU (HENDRIKSEN et al., 2004; MACHATKOVA et al., 2004). Esses fatores influenciam os resultados da produção de embriões.

Tem sido demonstrado que, em dia aleatório do ciclo estral, folículos > 8 mm de diâmetro possuem oócitos mais saudáveis do que folículos menores (CAROLAN et al., 1996). Além disso, vacas tratadas com FSH apresentam maior número de folículos médios (> 6 e < 10 mm) em comparação às vacas do grupo controle (GOODHAND et al., 1999). No entanto, outros autores relataram menor ou nenhum efeito da sincronização da onda de crescimento ou estágio de desenvolvimento folicular na PIVE em novilhas de corte ou leite, *Bos taurus*, *Bos indicus* ou cruzadas (GIMENES et al., 2015; RAMOS et al., 2010). Apesar disso, resultados animadores de PIVE foram observados quando novilhas holandesas, após terem o ciclo estral sincronizado, foram submetidas a seis doses de FSH com *coasting* de 48 horas (tempo entre o último FSH e a OPU), bem como um tratamento de LH 6 horas antes da OPU (BLONDIN et al., 2002). Os efeitos positivos da superestimulação com FSH podem ser associados ao aumento do diâmetro folicular e ao ambiente ideal em que o oócito adquire competência de desenvolvimento adequada (BLONDIN et al., 2002). Além disso, o *coasting* é considerado de extrema importância para o aumento das taxas de blastocisto (NIVET et al., 2012).

Embora os resultados apresentados por BLONDIN et al. (2002) e NIVET et al. (2012) sejam bastante convincentes e a indústria de embriões na América do Sul produza mais de 70% dos embriões PIVE do mundo (BLONDIN, 2015), a estratégia de superestimulação antes da OPU ainda é pouco utilizada neste continente. De fato, muitas vezes, nem mesmo a sincronização do ciclo estral ou da fase da onda foliculo previamente à OPU é implementada. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a PIVE em vacas holandesas não lactantes tratadas com protocolo similar ao descrito por NIVET et al. (2012) em comparação com a realização da OPU em dia aleatório do ciclo estral.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Animais e local

Foram utilizadas 35 vacas holandesas multíparas não lactantes e não gestantes ($5,8 \pm 1,78$ anos de idade, e escore de condição corporal [ECC] de $3,2 \pm$

0,30 [média $\pm$ desvio padrão, DP]). As vacas foram mantidas em galpões tipo *free-stall*, equipados com ventiladores e aspersores. A alimentação foi composta por silagem de milho e concentrado à base de milho, farelo de soja e mistura mineral comercial na forma de TMR (*Total Mixed Ration*). A dieta foi balanceada para atender ou exceder as exigências nutricionais de vacas leiteiras holandesas não lactantes (NRC, 2001) e fornecida *ad libitum*.

2.2.2 Delineamento experimental e tratamentos

As vacas foram aleatoriamente distribuídas em delineamento *crossover* nos seguintes grupos experimentais: Controle (n = 35), em que as vacas não foram tratadas com FSH, mas submetidas a uma sessão de aspiração em dia aleatório do ciclo estral; ou p-FSH (n = 35), em que, 36 horas após a OPU para sincronização da onda folicular, as vacas foram tratadas com p-FSH (Folltropin-V®, Bioniche Saúde Animal, Ontário, Canadá) e posteriormente submetidas a sessões de OPU. No grupo p-FSH, em um dia aleatório do ciclo estral, todos os folículos ≥ 7 mm de diâmetro foram aspirados para a sincronização da emergência da onda de crescimento folicular e as vacas receberam um implante auricular de norgestomet (Crestar®, MSD, São Paulo, Brasil). Trinta e seis horas depois, iniciaram-se os tratamentos com p-FSH, que consistiu em 240 mg i.m. que foi administrado em seis doses de 40 mg cada, com intervalo de 12 horas. A OPU foi realizada 44 horas após a última aplicação de p-FSH (*coasting*), quando o implante foi removido (Figura 2.1). O intervalo entre períodos experimentais foi de 14 dias.

2.2.3 Ovum pick-up (OPU) e produção *in vitro* de embriões (PIVE)

Antes das sessões de OPU, as vacas tiveram a região perineal limpa com água e álcool 70%. A anestesia epidural foi realizada administrando-se 5 mL de cloridrato de lidocaína 2% (Xylestesin, Cristália, Itapira, Brasil). Todos os folículos maiores do que 2,0 mm foram aspirados por meio de ultrassom (DP 2200; Mindray, Shenzhen, China), equipado com transdutor convexo de 7,5 MHz, e acoplada a uma guia de aspiração vaginal contendo um guia de agulha de aço inoxidável ligado a um sistema de vácuo (BV 003d, Watanabe Tecnologia Aplicada, Cravinhos, Brasil). A

PIVE (incluindo as sessões de OPU, maturação, fecundação e cultivo *in vitro*) foi realizada utilizando técnicas semelhantes às descritas por MONTEIRO et al. (2015)

A taxa de blastocistos foi avaliada no sétimo dia de cultivo de embriões.

Figura 2.1 - Diagrama esquemático dos tratamentos experimentais. **Grupo controle**, no dia aleatório do ciclo estral, as doadoras foram submetidas à punção folicular (OPU [●]; d 0). **Grupo p-FSH**, em um dia aleatório do ciclo estral, as doadoras receberam um implante auricular de norgestomet (Crestar®, Intervet, São Paulo, Brasil) e os folículos ≥ 7 mm de diâmetro foram aspirados para sincronização de onda (d -5,5). O tratamento com 240 mg de p-FSH i.m. (Folltropin-V®, Bioniche Saúde Animal, Ontário, Canadá), foi iniciado 36 horas depois, durante 3 dias (seis tratamentos de 40 mg p-FSH cada e 12 h de intervalo). OPU foi realizada 44 horas após a última aplicação de p-FSH. No D0, em ambos os grupos, todos os folículos $\geq 2,0$ mm foram aspirados

2.2.4 Análise estatística

Os dados contínuos foram analisados por meio dos procedimentos MIXED do e os dados binomiais foram analisados pelo procedimento GLIMMIX do SAS (Sistema para Windows, versão 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). As variáveis avaliadas foram: o número total de Cumulus Complexo Oócito (CCO) recuperado, número e percentagem de CCO viáveis, taxa de blastocistos e a proporção de vacas que produziram embriões. O modelo incluiu os efeitos fixos de tratamento e touros, e o efeito aleatório do período.

Diferenças de $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas e as de $0,05 < P \leq 0,10$ foram consideradas tendências. Os dados são mostrados como média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão.

2.3 Resultados e Discussão

O sucesso da PIVE está diretamente relacionado com o número e a qualidade dos CCO colhidos por OPU (BARUSELLI et al., 2012). O CCO de folículos maiores normalmente são mais saudáveis (CAROLAN et al., 1996) e o tratamento com p-FSH aumenta a proporção de folículos grandes e o número de embriões produzidos (GOODHAND et al., 1999). Outro fator que pode aumentar a taxa de blastocistos é o período de *coasting* ideal (NIVET et al., 2012). Portanto, nossa hipótese de que vacas leiteiras tratadas com p-FSH e tendo um período de *coasting* de 44 horas teriam aumentada a produção de embriões foi rejeitada, já que no presente estudo com 70 sessões de OPU não se detectou qualquer aumento na produção de embriões em vacas tratadas ou não com p-FSH (Tabela 2.1).

O número total de CCOs recuperados e o número de oócitos viáveis foram semelhantes entre os grupos controle e p-FSH (Tabela 2.1). Além disso, não houve aumento na proporção de COC viáveis (COC viáveis / COC total recuperado). Da mesma forma, vacas lactantes e não lactantes da raça Holandesa tratadas com quatro doses de p-FSH (total de 200 mg, 12 h de intervalo) não aumentaram a recuperação de oócitos em comparação com vacas sincronizadas, não tratadas com FSH (VIEIRA et al., 2014). Em outro estudo no qual se utilizaram seis doses de FSH não se detectou aumento do número de oócitos recuperados (GOODHAND et al., 1999). Independentemente de tratamentos, o número médio de CCO recuperado / vaca / sessão de OPU no presente estudo (18,3) foi maior do que o relatado por BOUSQUET et al. (1999), HASLER et al. (1995), PONTES et al. (2010) e VIEIRA et al. (2014).

Tabela 2.1 - Resultados (média dos quadrados mínimos $\pm$ EPM) de complexos cumulus-oócito (CCO) recuperados e a produção de blastocisto em vacas holandesas não lactantes submetidas à OPU, em dia aleatório do ciclo estral ou após a sincronização da onda de crescimento folicular e superestimulação ovariana com p-FSH (240 mg)

Item	Controle (n = 35)	p-FSH (n = 35)	EPM	P
Total de CCO recuperados (n)	719	562	-	-
Total de CCO recuperados/doadora/OPU (n)	20,5	16,0	2,20	0,15
CCO viáveis recuperados (n)	430	377	-	-
CCO viáveis recuperados/doadora/OPU (n)	12,3	10,7	1,64	0,49
CCO viáveis (%)	57,0	62,2	4,50	0,28
Total de Blastocistos (n)	94	105	-	-
Blastocistos/doadora/OPU (n)	2,6	3,0	0,51	0,66
Blastocistos/CCO (%) ^b	12,2	17,1	2,36	0,13
Blastocistos/CCO viáveis (%) ^a	21,9	28,6	3,76	0,28
Seções de OPU que resultaram em blastocistos/ seções totais de OPU (%)	74,3 (26/35)	80,0 (28/35)	-	0,67

^a Taxa de blastocisto calculada pela divisão do número de blastocisto e CCO recuperados viáveis

^b Taxa de blastocisto calculada pela divisão do número de blastocisto e CCO totais recuperados

A segunda hipótese foi levantada para responder à pergunta se o tratamento com p-FSH iria aumentar a produção de embriões / sessão de OPU e taxa de blastocistos. No presente estudo, não detectaram-se diferenças no número de embriões / sessão de OPU e taxa de blastocistos (Tabela 2.1). Alguns estudos têm associado resultados positivos com o aumento do tamanho do folículo e potencial competência oocitária após tratamento com p-FSH (SENDAG et al., 2008; VIEIRA et al., 2014). Outros estudos (GOODHAND et al., 1999), obtiveram efeito ligeiramente positivo sobre o número de embriões transferidos. No entanto, de acordo com SENEDA et al. (2001), a qualidade do ovócito, a taxa de clivagem e desenvolvimento de blastocisto não diferem entre folículo de tamanhos diferentes em bovinos leiteiros.

Parece que o desenvolvimento do oócito e maturação folicular estão desacoplados, o que faz com que haja assincronia entre os componentes nucleares e citoplasmáticos de maturação do oócito e, conseqüentemente, o desenvolvimento do oócito esteja comprometido (BLONDIN et al., 1996). Além disso, a administração de FSH, a fim de forçar uma população de folículos em fase de crescimento não irá proporcionar ambiente ideal para aquisição da competência de desenvolvimento (BLONDIN et al., 2002; MUNDIM et al., 2009). Para este fim, um período entre a última injeção de FSH e a OPU (*coasting*) é utilizado para melhorar a taxa de blastocistos (BLONDIN et al., 1997; NIVET et al., 2012), aumentando a capacidade de desenvolvimento de CCO (BLONDIN et al., 1997). Neste caso, os folículos em fases de pseudodominância ou atresia inicial deveriam proporcionar CCO com um ambiente ideal para aquisição da competência de desenvolvimento (BLONDIN et al., 2002). Curiosamente, o número de embriões / vaca / OPU no presente estudo (2,8) foi maior do que o descrito por HASLER et al. (1995) e ligeiramente maior que o descrito por Pontes (PONTES et al., 2010; 2.1). Em vacas holandesas não lactantes, o grupo não tratado de VIEIRA et al. (2014) apresentou resultados semelhantes aos do presente estudo (2.7). No entanto, quando administrado p-FSH, estes autores obtiveram maior número de embriões (4.4). Provavelmente, a variação dos resultados foi devido a diferentes procedimentos na PIVE ou por diferentes populações foliculares e quantidades de oócitos aspirados entre os grupos de vacas estudados.

Diversos estudos foram realizados (HENDRIKSEN et al., 2004; MACHATKOVA et al., 2004; GIMENES et al., 2015) para determinar a fase folicular ideal para maximizar os resultados da OPU. MACHATKOVA et al. (2004) observaram que o número médio de embriões por doadora e a taxa de desenvolvimento de oócitos a blastocistos foram mais elevados na fase de crescimento do que na fase de dominância. No entanto, GIMENES et al. (2015) constataram que a OPU realizada em momentos diferentes de uma onda folicular sincronizada (1, 3 ou 5 d após a emergência esperada) não influenciou o número de folículos, oócitos e blastocistos produzidos. De acordo com HENDRIKSEN et al. (2004), durante as diferentes fases de desenvolvimento do folículo existe sempre a presença de folículos em crescimento e outros em vários graus de atresia. Como mencionado anteriormente, RAMOS et al. (2010) também não encontraram nenhum efeito sobre a taxa de oócitos e blastocistos viáveis quando novilhas mestiças

tiveram seus folículos aspirados, uma ou duas vezes por semana. Estes estudos corroboram os resultados de que a eficiência da PIVE é semelhante, independentemente da fase folicular.

2.4 Conclusão

Nas condições do presente estudo, com vacas fornecendo uma quantidade relativamente alta de oócitos por sessão de OPU, o protocolo de superestimulação folicular com p-FSH, seguido de um período de *coasting* não aumentou a PIVE em vacas holandesas não lactantes. Desta forma, não foi recomendado seu uso no segundo experimento desta tese.

Referências

BARUSELLI, P.S.; SA´ FILHO, M.F.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U.; VIEIRA, L.M.; MENDANHA, M.F.; BO, G.A. Manipulation of Follicle Development to Ensure Optimal Oocyte Quality and Conception Rates in Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 47, p. 134-141, 2012.

BLONDIN, P. Status of embryo production in the world. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 12, p. 356-358, 2015.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M.A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine cytes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, p. 38-43, 2002.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.A. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 46, p. 1191-1203, 1996.

BLONDIN, P.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.A. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 48, p. 803-813, 1997.

BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 47, p. 1221-1236, 1997.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. In vitro embryo production in the cow: An effective alternative to

the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, p. 59-70, 1999.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; MERMILLOD, P. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 43, p. 477-483, 1996.

CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; MACHADO, G.M.; MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.N. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. **Theriogenology**, Stoneham, v. 74, p. 1521-1530, 2010.

DEMETRIO, D.G.B.; SANTOS, R.M.; DEMETRIO, C.G.B.; RODRIGUES, C.A.; VASCONCELOS, J.L.M. Factors affecting conception of AI or ET in lactating cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 207-208, 2006.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, Stoneham, v. 59, n. 2, p. 599-616, Jan 15 2003.

GIMENES, L.U., FERRAZ, M.L., FANTINATO-NETO, P., CHIARATTI, M.R., MESQUITA, L.G., SA FILHO, M.F., MEIRELLES, F.V., TRINCA, L.A., RENNO, F.P., WATANABE, Y.F., BARUSELLI, P.S. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect in vitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. **Theriogenology**, Stoneham, 83, 385-393, 2015.

GOODHAND, K.; WATT, R.G.; STAINES, M.E.; HUTCHINSON, J.S.M.; BROADBENT, P.J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, p. 951-961, 1999.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; MCCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine ivf embryos and subsequent calving resultS. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, n. 1, p. 141-152, 1995. I

HENDRIKSEN, P.J.M.; STEENWEG, W.N.M.; HARKEMA, J.C.; MERTON, J.S.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L.A.M.; DIELEMAN, S.J. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, p. 909-920, 2004.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, p. 329-335, Jan 15 2004.

MONTEIRO JR, P. L.J.; NASCIMENTO, A.B.; PONTES, G.C.S.; FERNANDES, G.O.; MELO, L.F.; WILTBANK, M.C.; SARTORI, R. Progesterone supplementation

after ovulation: Effects on corpus luteum function and on fertility of dairy cows subjected to AI or ET. **Theriogenology**, Stoneham, v. 84, p. 1215-1224, 2015.

MUNDIM, T.; RAMOS, A.F.; SARTORI, R.; DODE, M.A.N.; MELO, E.O.; GOMES, L.F.S.; RUMPF, R.M. F.M. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced in vitro, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, p. 1398-1407, 2009.

NIVET, A-L.; BUNEL, A.; LABRECQUE, R.; BELANGER, J.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M-A. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. **Reproduction**, Cambridge, v. 143, p. 165-171, 2012.

NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th rev. ed, p. 381, Washington, 2001.

PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I., SANCHES, B.V., ERENO-JUNIOR, J.C., UVO, S., BARREIROS, T.R.R., OLIVEIRA, J.A., HASLER, J.F., SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, p. 690-697, 2009.

PONTES, J.H.F., SILVA, K.C.F., BASSO, A.C., RIGO, A.G., FERREIRA, C.R., SANTOS, G.M.G., SANCHES, B.V., PORCIONATO, J.P.F., VIEIRA, P.H.S., FAIFER, F.S., STERZA, F.A.M., SCHENK, J.L., SENEDA, M.M. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v. 74, p. 1349-1355, 2010.

RAMOS, A.F.; RUMPF, R.; CAMARA, J.U.; MOLLO, M.R.; PIVATO, I.; MARQUES JR, A.P.; SARTORI, R. Effect of follicular wave synchronization on in vitro embryo production in heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 117, p. 201-207, Feb 2010.

SARTORI, R.; BASTOS, M.R.; BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; ERENO, R.L.; BARROS, C.M. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Reproduction in Domestic Ruminants**, Berlin, v. 67, p. 357-375, 2010.

SENDAG, S.; CETIN, Y.; ALAN, M.; HADELER, K-G.; NIEMANNB, H. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 106, p. 208-214, Jun 2008.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.M.; GARCIA, J.M.; OLIVEIRA, J.A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 67, p. 37-43, 2001.

STEWART, B.M.; BLOCK, J., MORELLI, P., NAVARETTE, A.E., AMSTALDEN, M., BONILLA, L., HANSEN, P.J., BILBY, T.R. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 3437-3445, 2011.

VIEIRA, L.M.; RODRIGUES, C.A.; CASTRO NETTO, A.; GUERREIRO, B.M.; SILVEIRA, C.R.A.; MOREIRA, R.J.C.; SÁ FILHO, M.F.; BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, P.S. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 82, p. 318-324, 2014.

WARD, F.A.; LONERGAN, P.; ENRIGHT, B.P.; BOLAND, M.P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. **Theriogenology**, Stoneham, v. 54, p. 433-446, 2000.

ZHANG, M.; LU, K.H.; SEIDEL, G.E. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 60, p. 1657-1663, 2003.

3 RESISTÊNCIA À INSULINA EM VACAS LEITEIRAS AOS 150 DIAS DE LACTAÇÃO NÃO ALTERA A QUALIDADE DOS OÓCITOS DE FOLÍCULOS PEQUENOS

Resumo

O objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que vacas leiteiras de alta produção se tornam cada vez mais resistentes à insulina com o avançar da lactação, e, consequentemente, a qualidade do oócito é comprometida. Foram utilizadas vacas holandesas aos 50 ($51,5 \pm 3,7$; $n = 30$), 100 ($102,3 \pm 9,4$; $n = 30$) e 150 ($154,5 \pm 18,9$; $n = 30$) dias de lactação (DEL). Insulina e glicose circulantes foram medidas e o teste de tolerância à glicose (TTG) foi realizado após 5 horas de jejum. Para avaliar a qualidade do oócito, a punção folicular (OPU) foi realizada no dia anterior ao TTG (581 oócitos). As análises estatísticas foram realizadas por meio dos procedimentos MIXED do SAS ($P < 0,05$). Durante o TTG, não houve diferença entre grupos para qualquer variável relacionada com glicose circulante (por exemplo, pico de glicose = $194,2 \pm 4,9$, $195,3 \pm 4,8$ e $188,5 \pm 4,8$ mg/dL). No entanto, várias medidas de insulina circulante foram diferentes em vacas aos 150 DEL em comparação a 50 ou 100 DEL, tais como: maior insulina basal ($9,5 \pm 1,0^a$, $9,6 \pm 1,1^a$ e $12,5 \pm 1,0^b$ uUI/mL), pico ($67,9 \pm 7,3^a$, $67,7 \pm 7,0^a$ e $88,3 \pm 7,2^b$ uUI/mL), Δ max de insulina ($54,4 \pm 5,4^a$, $58,9 \pm 5,3^a$ e $72,4 \pm 5,5^b$ uUI/mL) e AUC 5-60 ($1957,5 \pm 173,2^a$, $2174,9 \pm 168,8^a$ e $2633,9 \pm 179,8^b$ uUI/mLxmin). No entanto, não houve diferença entre os grupos para o número ($3,4 \pm 0,7$, $3,9 \pm 0,7$ e $3,8 \pm 0,7$ oócitos/vaca/OPU) ou porcentagem ($48,3 \pm 0,1$, $52,7 \pm 0,1$ e $53,0 \pm 0,1\%$) de oócitos viáveis. Assim, o aumento da insulina circulante antes e durante todo o TTG em vacas aos 150 DEL, indica que as vacas desenvolveram resistência à insulina com o aumento dos dias em lactação. No entanto, o aumento da resistência à insulina não foi associado à alteração detectável na qualidade dos oócitos aspirados de folículos pequenos e médios.

Palavras-chave: Bovinos de leite; Teste de tolerância à glicose; *Ovum pick-up*; Reprodução

Abstract

The objective of this study was to test the hypothesis that high-producing dairy cows become increasingly resistant to insulin throughout lactation, and consequently oocyte quality is compromised. Holstein cows at 50 (51.5 ± 3.7 ; $n = 30$), 100 (102.3 ± 9.4 ; $n = 30$) and 150 (154.5 ± 18.9 ; $n = 30$) days in milk (DIM) were used. Circulating insulin and glucose were measured and a glucose tolerance test (GTT) was performed after 5 h of fasting. To evaluate oocyte quality, ovum pick-up (OPU) was performed on the day before the GTT (581 oocytes). Statistical analyses were performed using the MIXED procedure of SAS ($P < 0.05$). During the GTT, there was no difference between groups for any variable related to circulating glucose (for example, glucose peak = 194.2 ± 4.9 , 195.3 ± 4.8 and 188.5 ± 4.8 mg/dL). However, various measures of circulating insulin were different in cows at 150 DIM compared to 50 or 100 DIM such as: higher basal insulin (9.5 ± 1.0^a , 9.6 ± 1.1^a and 12.5 ± 1.0^b

$\mu\text{IU/mL}$), peak (67.9 ± 7.3^a , 67.7 ± 7.0^a and 88.3 ± 7.2^b $\mu\text{IU/mL}$), Δ max insulin (54.4 ± 5.4^a , 58.9 ± 5.3^a and 72.4 ± 5.5^b $\mu\text{IU/mL}$) and AUC 5-60 (1957.5 ± 173.2^a , 2174.9 ± 168.8^a and 2633.9 ± 179.8^b $\mu\text{IU/mL} \times \text{min}$). Nevertheless, there was no difference among groups in the number (3.4 ± 0.7 , 3.9 ± 0.7 and 3.8 ± 0.7 oocytes/cow/OPU) or percentage (48.3 ± 0.1 , 52.7 ± 0.1 and $53.0 \pm 0.1\%$) of viable oocytes. Thus, increased circulating insulin before and throughout the GTT in cows at 150 DIM cows, indicates that cows develop increasing insulin resistance with increasing DIM; however, increased insulin resistance was not associated with a detectable alteration in the quality of oocytes aspirated from small and medium-sized follicles.

Keywords: Dairy cattle; Glucose tolerance test; Ovum pick-up; Reproduction

3.1 Introdução

A eficiência reprodutiva possui grandes impactos econômicos sobre rebanhos leiteiros (STEVENSON et al., 2008). No entanto, muitos fatores afetam a eficiência reprodutiva em fazendas leiteiras, incluindo a incidência de doenças uterinas e não uterinas, estresse calórico, estratégias de manejo reprodutivo e alto metabolismo de hormônios esteroides associado ao alto consumo alimentar (WALSH; WILLIAMS; EVANS, 2011).

Um fator que pode impactar na fertilidade é o balanço energético negativo (BEN), que ocorre durante o período pós-parto precoce em grande parte das vacas leiteiras (BUTLER et al., 2003; CARVALHO et al., 2014; WILTBANK et al., 2014). Vacas com BEN apresentam redução do fluxo de nutrientes necessários para os eventos reprodutivos (LEROY et al., 2008b) com corresponde redução na frequência de pulsos de hormônio luteinizante, glicemia, IGF-I, insulina e produção de estradiol pelo folículo dominante, acarretando em maior incidência de anovulação (BUTLER, 2000). Além disso, a perda de escore de condição corporal (ECC) e do peso corporal pós-parto está associado com redução da fertilidade em vacas, possivelmente devido a um impacto de BEN sobre a qualidade do oócito, com subsequente redução no desenvolvimento embrionário precoce (CARVALHO et al., 2014). Assim, alguns estudos evidenciam que vacas com elevado ECC próximo ao parto, posteriormente, tiveram maior perda de ECC após o parto, levando à mobilização excessiva de ácidos graxos não esterificados (AGNE; LEROY et al., 2008a) hiperinsulinemia e subsequente resistência à insulina (SINCLAIR, 2010). PIRES; SOUZA; GRUMMER (2007) mostraram uma relação positiva e direta entre AGNE e

resistência à insulina em vacas da raça holandesa, induzindo hiperlipidemia através de infusão intravenosa de emulsão de sebo.

Além da resistência à insulina durante o início da lactação, vacas em estágios mais avançados de lactação também pode sofrer com os efeitos negativos da resistência à insulina devido ao desenvolvimento de hiperinsulinemia associado a períodos de alta ingestão prolongada, com o aumento do ECC à medida que a lactação progride. ADAMIAK et al. (2005) relataram que a hiperinsulinemia em novilhas mestiças leiteiras foi associada com diminuição da qualidade do oócito. Este estudo indicou um efeito benéfico do aumento de energia na dieta de novilhas de baixa ECC, porém um efeito negativo da alta energia sobre oócitos de animais com ECC moderadamente elevados. Estudos também mostraram redução na qualidade dos embriões produzidos *in vivo* (BASTOS et al., 2009) ou *in vitro* (SALES et al., 2015), depois de um longo período (> 5 a 8 semanas) de ingestão de alta energia. É provável que, em todos estes estudos anteriores, os animais apresentaram hiperinsulinemia. Além disso, um dos estudos demonstraram que as vacas não lactantes tornaram-se resistentes à insulina, com base nos resultados de teste de tolerância à glucose (TTG), depois de um período de 102 dias sob consumo de dietas com alta densidade energética (SALES et al., 2015).

Com base em todos estes resultados, a hipótese é de que vacas leiteiras em dieta de alta energia, se tornam cada vez mais resistentes à insulina à medida em que a lactação progride. Essa hipótese foi testada por meio da realização do TTG em vacas de alta produção em diferentes dias em lactação (DEL). Além disso, outra hipótese foi de que a resistência à insulina estaria associada à redução na qualidade dos oócitos aspirados de folículos pequenos e médios.

3.2 Materiais e Métodos

Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) / Universidade de São Paulo (CEUA-ESALQ / 2013-10).

3.2.1 Animais e Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido entre os meses de julho e outubro (inverno e primavera) de 2013, em uma fazenda no Estado de São Paulo, Brasil, se utilizando vacas holandesas primíparas e múltiparas aos 50 ($51,5 \pm 3,7$; $n = 30$), 100 ($102,3 \pm 9,4$; $n = 30$) e 150 ($154,5 \pm 18,9$; $n = 30$) DEL. O estudo foi delineado em três períodos, com intervalos de 50 dias e cada tratamento foi composto por grupos contemporâneos. Assim, começou-se o estudo com três grupos, A, B e C, alocados em 50, 100 e 150 DEL, respectivamente, com 10 vacas cada. Após cinquenta dias, para o segundo período, os grupos A e B foram alocados nos tratamentos 100 e 150 DEL, respectivamente, e um novo grupo (grupo D) de 10 vacas, com aproximadamente 50 DEL foi adicionado ao estudo no tratamento 50 DEL. No último período, 100 dias após o primeiro período, os grupos A e D representaram os tratamentos 150 e 100 DEL e 10 novas vacas foram designadas ao grupo E, representando o tratamento 50 DEL. Assim, 50 vacas foram utilizadas no total (Figura 3.1) e cada período de avaliação teve representação de cada um dos três grupos de DEL a fim desse controlar quaisquer efeitos do período de avaliação.

As vacas foram alojadas em instalação tipo *freestall* equipado com ventiladores e aspersores. As vacas foram alimentadas *ad libitum* por meio de dieta única sob a forma de ração total (TMR) composta por silagem de milho, cevada, sementes de algodão, milho, polpa cítrica e concentrado à base de farelo de soja com minerais e vitaminas, que foi balanceada equilibrada para atender ou exceder as exigências nutricionais de vacas da raça holandesa (NRC, 2001) e a quantidade fornecida de acordo com a produção diária média de leite. As vacas não foram inseminadas até o final do período experimental para evitar efeitos que causassem confundimento.

As ordenhas foram realizadas três vezes ao dia, 4, 11 e 21h em sistema de ordenha automatizada (GEA Westfalia Separator Brasil, São Paulo, Brasil). A produção de leite foi mensurada antes do início do TTG, bem como a avaliação do ECC [1 (muito magra) a 5 (obeso) escala; Elanco Saúde Animal, 2009)].

Figura 3.1 - Representação esquemática do delineamento experimental, no qual três períodos intervalados de 50 dias continham grupos contemporâneos para cada tratamento (n = 30). O primeiro período (julho), com três grupos (A, B e C, de 50, 100 e 150 DEL, respectivamente) compostos por 10 vacas cada. No segundo período (agosto), os grupos A e B foram alocados para os tratamentos 100 e 150DEL, respectivamente, e um novo grupo (D com 10 vacas) representaram o grupo de 50 DEL. No último período (outubro), os grupos A e D, representaram os tratamentos 150 e 100 DEL, respectivamente, e um novo grupo (E com 10 vacas) foi adicionado ao tratamento 50 DEL. Cinquenta vacas foram utilizadas no total

3.2.2 Ovum pick-up (OPU)

As vacas foram submetidas a sessões de OPU, no dia anterior a cada TTG, em momento aleatório do ciclo estral. A área perineal foi limpa com etanol a 70% e água e a anestesia epidural realizada por meio da aplicação de 5 ml de cloridrato de lidocaína a 2% (Xylestesin, Cristália, Itapira, Brasil). Todos os folículos $\geq 3,0$ mm foram aspirados por meio de ultrassom transvaginal (DP-2200; Mindray, Shenzhen, China), que estava equipado com um transdutor convexo de 7,5 MHz, e acoplado a uma guia de aspiração vaginal, contendo um guia de agulha de aço inoxidável ligado a um sistema de vácuo (BV 003d, Watanabe Tecnologia Aplicada, Cravinhos, Brasil). A aspiração folicular foi realizada utilizando pressão de vácuo de 146 mmHg, por meio de um tubo de metal (1,1 mm de diâmetro interno x 1,20 m de comprimento) acoplado à agulha hipodérmica descartável (18-GA). Os oócitos foram aspirados em meio *holding* (TCM 199; Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB; Gibco BRL, Nova Iorque,

EUA), de 10.000 UI de heparina sódica/L (Liquemine®, Roche, São Paulo, Brasil). Um total de 581 oócitos foi coletado. Complexos cumulus oócito (CCO) foram separados e classificados de acordo com o número de camadas de células do cumulus e homogeneidade do citoplasma: grau 1, mais de três camadas e citoplasma homogêneo; grau 2, pelo menos uma camada de células do cumulus e citoplasma homogêneo; grau 3, desnudado, parcialmente coberto com células do cumulus, ou sem células do cumulus; viáveis: os tipos 1 a 3; degenerados: oócitos com a perda de células do cumulus da maior parte da zona pelúcida e / ou vacuolização e a contração do citoplasma (VIANA et al., 2010; MONTEIRO et al., 2015).

3.2.3 TTG e análises laboratoriais

O TTG foi realizado após 5 horas de jejum, às 7h. As amostras de sangue foram colhidas nos tempos -20, -10, 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, e 120 minutos em relação à infusão de 0,3 g de glicose por kg de peso corporal (solução estéril de glucose a 50% p/v; Fresenius Kabi, Brasil) na veia jugular por $9,6 \pm 3,2$ minutos (média $\pm$ DP).

Para mensurar as concentrações circulantes de insulina, AGNE (somente em 0 min) e glicose, amostras de sangue foram colhidas em tubos heparinizados, sem anticoagulante ou com fluoreto de sódio, respectivamente (Vacutainer, Becton-Dickinson e Company, EUA). Os tubos foram mantidos em gelo e, posteriormente, centrifugados a $1.700 \times g$ durante 15 minutos a 4 °C. Alíquotas de plasma ou de soro foram armazenadas a -20 °C até serem analisadas.

As dosagens de insulina (uUI/mL) foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia Animal da UNESP-Araçatuba, por meio de kit de radioimunoensaio para insulina suína (Millipore Corporation, Billerica, MA) com especificidade de 90% para insulina bovina. As concentrações de AGNE (mmol/mL) foram determinadas pelo método colorimétrico enzimático utilizando-se o kit comercial (AGNE, Randox Laboratories Ltd., Co. Antrim, Reino Unido). As concentrações de glicose (mg/dL) foram mensuradas pelo método colorimétrico enzimático por meio do kit Glicose Liquiform (Labtest, Lagoa Santa, Brasil) no Laboratório de Metabolismo Animal da Esalq-USP. Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram de 8,7 e 12,2% para a insulina, 3,4 e 3,6% para AGNE e 4,7 e 5,1% para a glicose.

3.2.4 Cálculos e Análise Estatística

As concentrações médias de glicose ou insulina medidas a -20, -10 e 0 min foram utilizadas como concentrações basais. Delta máximo de insulina ($\Delta_{\max}$), taxa de *clearance* (k, %/min; decaimento após o pico) e o tempo para atingir metade da concentração máxima ($t_{1/2}$, min) foram calculados a partir das concentrações de insulina e glicose. Os parâmetros foram calculados com as seguintes equações: $\Delta_{\max}$ = Valor máximo de concentração de insulina – concentração basal de insulina; $K = [(\ln \text{glicose } t_{10} - \ln \text{glicose } t_{40}) / t_{40} \text{ glicose} - t_{10} \text{ glicose}] \times 100$; $T_{1/2} = (0,693/k) \times 100$; glicose T10 e T40 são as concentrações de glicose aos 10 e 40 minutos após infusão, respectivamente. As áreas sob a curva (AUC) de glucose e de insulina durante o TTG foram calculadas utilizando-se o método trapezoide (OPSOMER et al., 1999). A sensibilidade à insulina, tal como determinado pela avaliação do modelo da homeostase de resistência à insulina (HOMA-IR) foi também testada. HOMA-IR foi calculado de acordo com uma fórmula apresentada por MATTHEWS et al. (1985) e HACKBART et al. (2013): $([\text{Insulina (uUI/mL)}] \times [\text{glicose (mmol/L)}]) / 22.5$.

A análise estatística dos dados contínuos, tais como AGNE, AUC, $\Delta_{\max}$, k, $t_{1/2}$, e qualidade de oócitos foram realizados por meio do procedimento MIXED do SAS, versão 9.3 (SAS / STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC). O modelo incluiu os efeitos fixos de DEL, período, ordem de parto (primípara ou multípara) e categoria de ECC, bem como o efeito aleatório de vaca dentro de grupo (A, B, C, D, E). Quando o valor de P de cada um destes efeitos foi maior do que 0,20, os mesmos foram removidos.

A análise estatística dos dados contínuos com medidas repetidas ao longo do tempo, como glicose e insulina circulantes, foram realizadas por meio dos procedimentos MIXED do SAS, versão 9.3. Os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e os dados com os resíduos não normalmente distribuídos foram transformados em logaritmo de base 10, antes da realização da análise. O modelo incluiu os efeitos fixos de DEL, período, tempo, e interação entre DEL e tempo. A produção de leite, ECC, concentração plasmática basal de glicose e insulina foram utilizados como covariáveis, e vaca dentro do grupo foi efeito aleatório. Essas covariáveis foram removidas quando o nível de significância foi maior do que 0,20. A correlação entre

a concentração basal de insulina basal ou HOMA-IR e oócitos viáveis foram analisados por meio do procedimento PROC CORR do SAS.

Diferenças com $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas e aquelas com $0,05 < P \leq 0,10$ foram consideradas tendências.

3.3 Resultados

3.3.1 ECC e produção de leite

A produção de leite foi menor aos 150 DEL em comparação aos 50 e 100 DEL (34,2; 38,0 e 38,6 $\pm$ 1,4 kg/d, respectivamente; $P \leq 0,05$). O ECC foi menor aos 50 DEL em comparação aos 100 e 150 DEL (2,8; 3,0 e 3,0 $\pm$ 0,1, respectivamente; $P \leq 0,05$).

3.3.2 TTG

A concentração plasmática basal de glicose foi menor aos 50 DEL, atingindo concentração máxima entre 5 a 10 minutos pós infusão de glicose (Figura 3.2). Não houve efeito de tratamento ($P = 0,76$), mas houve efeito de tempo ($P < 0,001$), e interação tratamento e tempo ($P = 0,03$) nas concentrações circulantes de glicose. No entanto, o DEL não afetou significativamente o pico de glicose ($P = 0,57$). Da mesma forma, nenhum efeito do estágio de lactação sobre a taxa de *clearance* de glicose (K; %/min; $P = 0,99$), $t_{1/2}$ (min; $P = 0,97$), AUC 5-60 ($P = 0,22$), e AUC 5-120 ($P = 0,83$) foi observado, indicando uma taxa semelhante para a utilização de glicose (Tabela 3.1).

As concentrações séricas de AGNE foram maiores ($P = 0,01$) em vacas aos 50 DEL em comparação aos outros grupos (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Concentração de glicose basal, área sob a curva (AUC) para a concentração de glicose, concentração de AGNE aos 0 min, e respostas ao teste de tolerância à glicose intravenosa (TTG; 0,3 g/kg P.C. de glicose i.v.) para vacas holandesas aos 50, 100 ou 150 dias em lactação (DEL) ¹

Item ²	DEL			P
	50 (n = 30)	100 (n = 30)	150 (n = 30)	
Glicose basal (mg/dL)	65,0 ± 0,78 ^a	67,3 ± 0,80 ^b	68,8 ± 0,80 ^b	0,001
Pico (mg/dL)	191,7 ± 8,31	200,8 ± 7,49	194,3 ± 7,14	0,57
k (%/min)	1,4 ± 0,12	1,5 ± 0,12	1,5 ± 0,11	0,99
t1/2 (min)	51,6 ± 5,53	50,9 ± 5,41	52,8 ± 5,31	0,97
AUC 5-60 (mg/dL x min)	7619,8 ± 259,52	7264,4 ± 246,16	7033,4 ± 250,52	0,22
AUC 5-120 (mg/dL x min)	11937,0 ± 414,34	12172,0 ± 414,55	11871,0 ± 389,08	0,83
AGNE, mmol/L	0,6 ± 0,03 ^a	0,4 ± 0,03 ^b	0,4 ± 0,03 ^b	0,01

^{a, b} Médias dentro de uma linha com diferentes sobrescritos são diferentes ($P \leq 0,05$).

¹ Os dados são apresentados como média dos quadrados mínimos ± erro padrão.

² K = taxa de clearance de glicose; t1/2 = tempo para alcançar metade da concentração máxima de glicose; AUC 5-60 = Área sob a curva de concentração de glicose entre 5 e 60 minutos; 5-120 AUC = Área sob a curva de concentração de glicose entre 5 e 120 minutos.

Figura 3.2 - Perfil de glicose circulante em resposta ao teste de tolerância à glicose intravenosa (TTG; 0,3 g/kg de peso corporal médio de glicose i.v) em vacas aos 50 (50 DEL; n = 30), 100 (100 DEL; n = 30) e 150 (150 DEL; n = 30) dias em lactação. Efeitos fixos no modelo estatístico para as análises de concentração de glicose após o TTG: tratamento (P = 0,76); tempo (P < 0,001); tratamento x tempo (P = 0,03)

A Figura 3.3 mostra o perfil de alterações nas concentrações circulantes de insulina após o TTG para os três grupos de vacas em lactação. Houve efeito de tratamento (P = 0,03) e efeito de tempo (P < 0,001), mas não de interação tratamento e tempo (P = 0,86). As vacas aos 150 DEL apresentaram maiores concentrações circulantes de insulina aos 5, 10, 20, 30, e 40 minutos após o início da infusão de glucose, em comparação às vacas em 50 ou 100 DEL. Várias medidas de insulina circulante foram calculadas com base no TTG (Tabela 3.2). As vacas aos 150 DEL apresentaram concentração de insulina basal que tendeu a ser maior (P = 0,06), e tiveram maior (P = 0,04) pico de concentração de insulina, uma maior variação (P = 0,02) em insulina para atingir a concentração máxima a partir do basal (Δ max), e maior (P = 0,01) AUC 5-60 de insulina. A AUC 5-120 de insulina não foi diferente entre grupos (P = 0,21).

Figura 3.3 - Perfil de insulina circulante em resposta ao teste de tolerância à glicose intravenosa (TTG; 0,3 g/kg de peso corporal médio de glicose i.v.) em vacas aos 50 (50 DEL; n = 30), 100 (100 DEL; n = 30) e 150 (150 DEL; n = 30) dias em lactação. Efeitos fixos no modelo estatístico para as análises de concentração de insulina após o TTG: tratamento (P = 0,03); tempo (P < 0,001); tratamento x tempo (P = 0,86). Dentro de hora, um asterisco (*) representa um efeito de tratamento (P ≤ 0,05)

HOMA-IR foi calculado para vacas nos três grupos de tratamento. As vacas aos 150 DEL tiveram maior HOMA-IR ($2,15 \pm 0,24$; P = 0,03) do que as vacas aos 50 ($1,47 \pm 0,16$) ou 100 ($1,56 \pm 0,18$) DEL.

Tabela 3.2 - Respostas de insulina no plasma para o teste de tolerância à glicose intravenosa (GTT; 0,3 g/kg de P.C. de glicose i.v.) em vacas da raça holandesa aos 50, 100 ou 150 dias em lactação (DEL) ¹

Insulina	DEL			P
	50 (n = 30)	100 (n = 30)	150 (n = 30)	
Insulina basal (μIU/mL)	9,5 ± 1,01 ^A	9,6 ± 1,06 ^A	12,5 ± 1,04 ^B	0,06
Pico (μUI/mL)	67,9 ± 7,28 ^a	67,7 ± 7,03 ^a	88,3 ± 7,19 ^b	0,04
Δ máx (μUI/mL)	54,4 ± 5,43 ^a	58,9 ^b ± 5,29 ^a	72,4 ± 5,45 ^b	0,02
AUC 5-60 (μUI/mL x min)	1957,5 ± 173,24 ^a	2174,9 ± 168,8 ^a	2633,9 ± 179,77 ^b	0,01
AUC 5-120 (μUI/mL x min)	2873,0 ± 253,70	2880,6 ± 261,22	3420,3 ± 264,27	0,21

^{a, b} Médias dentro de uma linha com diferentes sobrescritos são diferentes ($P \leq 0,05$).

^{A, B} Médias dentro de uma linha com diferentes sobrescritos tendem a diferir ($0,05 < P \leq 0,10$).

¹ Os dados são apresentados como média dos quadrados mínimos ± erro padrão.

² Δ máx = concentração máxima de insulina - concentração de insulina basal; AUC 5-60 = Área sob a curva de concentração de insulina entre 5 e 60 minutos; 5-120 AUC = Área sob a curva de concentração de insulina entre 5 e 120 min

3.3.3 Qualidade do oócito

A Tabela 3 mostra as medidas de oócitos para os três grupos de DEL. O número total de oócitos recuperados por vaca por sessão de OPU foi semelhante entre os grupos ($P > 0,49$). Também não houve efeito ($P > 0,20$) do DEL no número de grau 1, grau 2, grau 3, ou CCO não viáveis, o que resultou em porcentagens semelhantes (48 a 53%) de CCO viáveis (graus 1-3) entre grupos.

As análises de correlação foram realizadas para avaliar a relação entre as concentrações basais de insulina ou HOMA-IR de cada vaca e a porcentagem de CCO viáveis, sem considerar o grupo de tratamento para cada vaca. Estas análises não indicaram nenhuma correlação entre a concentração de insulina basal e qualidade do oócito ($r = 0,02$; $P = 0,81$) ou entre HOMA-IR e qualidade do oócito ($r = 0,05$; $P = 0,72$).

Tabela 3.3 - Resultados de complexos cumulus oócito (CCO) recuperados de vacas holandesas submetidas a punção folicular (OPU) aos 50, 100 ou 150 dias em lactação (DEL) ¹

CCO ²	DEL			P
	50 (n = 30)	100 (n = 30)	150 (n = 30)	
Total (n)	5,7 ± 1,07	6,5 ± 1,02	7,3 ± 1,07	0,49
Grau 1 (n)	0,3 ± 0,10	0,4 ± 0,11	0,4 ± 0,11	0,54
Grau 2 (n)	1,2 ± 0,27	1,3 ± 0,27	1,2 ± 0,27	0,96
Grau 3 (n)	1,8 ± 0,50	2,3 ± 0,48	2,2 ± 0,50	0,75
Não viáveis (n)	2,3 ± 0,53	2,7 ± 0,52	3,5 ± 0,53	0,28
Viáveis (%)	48,3 ± 0,05	52,7 ± 0,05	53,0 ± 0,05	0,78

¹ Os resultados são apresentados como média dos quadrados mínimos ± erro padrão por vaca por sessão de OPU.

3.4 Discussão

Estudos prévios relataram resistência à insulina em bovinos em uma variedade de condições fisiológicas, tais como: vacas em lactação durante o balanço energético negativo (HOLTENIUS et al., 2003; BOSSAERT et al., 2008), em vacas com lactações prolongadas manejadas sob pastejo (MARETT et al., 2015), tratadas com glicocorticóides (HACKBART et al., 2013), e alimentadas com dietas de alta densidade energética por longos períodos de tempo (HOLTENIUS et al., 2003; LEIVA et al., 2014). Além disso, os numerosos transtornos metabólicos e problemas reprodutivos que acompanham o desenvolvimento da resistência à insulina têm sido discutidos em diversas espécies de mamíferos (NICOD; BESSE; TAPPY, 2002; RHEE et al., 2004; ADAMIAK et al., 2005). Um dos mais novos aspectos deste estudo foi a observação de que, durante a lactação normal, vacas desenvolvem sinais óbvios e clássicos de resistência à insulina aos 150 dias em lactação. Este estudo foi conduzido de forma a reduzir os muitos efeitos de potencial confundimento que estão presentes em outros estudos. Por exemplo, cada período de tratamento foi constituído por grupos contemporâneos para contabilizar os efeitos do período. Além disso, as vacas não foram inseminadas durante o experimento para evitar os efeitos de prenhez ou vacas *repeat breeder* que permaneceram não prenhes até os 150 DEL. Por fim, o experimento foi realizado durante o inverno e

primavera para evitar os efeitos adversos das altas temperaturas no verão sobre a qualidade do oócito. Assim, o delineamento experimental permitiu o teste válido de nossas duas hipóteses específicas. A principal hipótese deste estudo foi de que as vacas se tornam resistentes à insulina quando o DEL aumenta. Esta hipótese foi sustentada pelo aumento da insulina basal, HOMA-IR, e resposta ao TTG que foram todos indicativos de desenvolvimento de resistência à insulina em vacas aos 150 DEL. A segunda hipótese era de que, as vacas com o aumento da resistência à insulina teriam redução na qualidade do oócito. A maioria das medidas de reprodução não pode ser validamente testada em experimentos com apenas 30 vacas por grupo de tratamento, devido à natureza da maior parte das respostas binomiais. No entanto, devido aos vários oócitos colhidos de cada vaca em cada ponto de tratamento, fomos capazes de ter 581 observações neste estudo. Isto permitiu que cada vaca pudesse ser avaliada para a qualidade do oócito de forma válida, o que aumentou a confiabilidade do nosso teste para a segunda hipótese. Com base em nossas avaliações do número de oócitos e de qualidade, não encontramos nenhum suporte para a segunda hipótese de que oócitos coletados principalmente a partir de folículos pequenos e médios tivessem menor qualidade pela resistência à insulina. Estes resultados fornecem percepções interessantes sobre as relações que ocorrem durante a lactação entre o consumo de ração, produção de leite, estado metabólico da vaca e reprodução.

No início da lactação, a maior demanda de energia para suportar o aumento dramático da produção de leite não está acoplada aos aumentos suficientes no consumo de matéria seca, resultando em balanço negativo de energia. Assim, o início da lactação geralmente é marcado pelo aumento das concentrações circulantes de AGNE, já que a gordura corporal é mobilizada (GRUMMER, 1993). Esse aumento se deve à maior lipólise e menor lipogênese, provavelmente associado à reduzida concentração plasmática de insulina (CHILLIARD et al., 2000), que é característico do período pós-parto (BELL, 1995). O primeiro momento avaliado em nosso estudo foi o de 50 DEL, no entanto, ainda havia um aumento detectável de AGNE na circulação em vacas aos 50 DEL em comparação com 100 ou 150 DEL. As vacas no início da lactação (50 DEL) podem ter mobilizado gordura corporal para suportar a energia requerida para a lactação e, portanto, tiveram maior AGNE circulante (BJERRE-HARPOTH et al., 2012) em comparação a vacas aos 100 e 150 DEL. Estudos anteriores mostraram uma correlação negativa entre as

concentrações de AGNE e AUC de insulina e as concentrações máximas de insulina (BOSSAERT et al., 2008). O tecido adiposo e seus derivados desempenham um papel crucial na determinação e modulação da sensibilidade à insulina no metabolismo da glicose em vacas leiteiras (DE KOSTER E OPSOMER, 2013). Estudos manipulativos diretos também têm demonstrado que o excesso de AGNE circulante por infusão abomasal de gordura produz resistência periférica à insulina em vacas não lactantes (PIRES; PESCARA; GRUMMER, 2007; PIRES, SOUZA; GRUMMER, 2007). O excesso de AGNE pode induzir à fosforilação do substrato do receptor da insulina 1 (IRS-1) em resíduos de serina e diminuir a fosforilação da tirosina do IRS-1, que é necessária para a ativação normal da cascata de sinalização da insulina (LE MARCHAND-BRUSTEL et al., 2003). No entanto, apesar da elevação de AGNE circulante nas vacas aos 50 DEL em nosso estudo, não houve diferença na insulina basal, glicose ou HOMA-IR entre vacas aos 50 e 100 DEL. Assim, o aumento das concentrações circulantes de AGNE aos 50 DEL não foi acompanhado por qualquer evidência de resistência à insulina ou reduzida capacidade de resposta à insulina induzida por glicose em nosso estudo.

Com o avançar da lactação houve diminuição na produção de leite e aumento do ECC. Estes resultados indicam uma mudança na partição de nutrientes da produção de leite para armazenamento de tecido corporal a medida em que a lactação progride (MARETT et al., 2011). Assim, as concentrações basais de glicose no plasma foram menores para vacas aos 50 DEL em comparação com 100 ou 150 DEL e as concentrações de insulina no plasma tenderam a ser maiores quando a lactação progrediu. Estes resultados são consistentes com a diminuição na partição de glicose para a glândula mamária para a síntese de leite e a pequena elevação de glicose circulante, resultando em aumento de insulina aos 150 DEL. A glicose é o principal precursor para a síntese de lactose na glândula mamária (BJERRE-HARPOTH et al., 2012). Dentro da célula epitelial, a lactose cria uma pressão osmótica que determina a quantidade de leite produzido. A captação da glicose pela glândula mamária em vacas leiteiras de alta produção é responsável por 50 a 85% do consumo de glicose em todo o corpo (DE KOSTER E OPSOMER, 2013). Assim, como a produção de leite diminui após pico de lactação, as vacas tendem a ter maior ingestão de energia do que a demanda para a produção de leite, e o consequente aumento de glicose circulante estimularia a maior secreção de insulina pelo pâncreas.

Assim, as vacas em 150 DEL apresentaram todas as respostas características aos testes de resistência à insulina. As concentrações basais de insulina e de glucose estavam elevadas, como medido após 5 horas de jejum e insulina circulante aumentou para uma extensão expressivamente maior durante o desafio de glucose de um TTG padrão. A semelhança no *clearance* de glicose nas diferentes fases de lactação fornece suporte para a ideia de que, com prosseguir do quinto mês de lactação, há maior liberação de insulina em resposta a uma determinada carga de glucose. Apesar das concentrações de insulina serem mais baixas nas fases iniciais da lactação, AUC de glucose foi semelhante entre 150 DEL e estágios iniciais de lactação. Além disso, as maiores concentrações de insulina circulantes não resultaram em maior absorção de glucose por tecidos periféricos, indicando resistência à ação da insulina. O aumento do HOMA-IR em vacas aos 150 DEL é mais um indicativo de que as vacas se tornam resistentes à insulina à medida que a lactação avança.

Estudos anteriores em diferentes espécies animais demonstraram que a ingestão prolongada de dietas de alta energia produziu resistência à insulina (RAVUSSIN; SMITH, 2002; ADAMIAK et al., 2005; KOHJIMA; SUN; CHAN, 2010). Por exemplo, vacas leiteiras não lactantes *Bos indicus* (Gir) e *Bos taurus* (Holandês) que foram alimentadas com uma dieta de alta energia durante 102 dias tiveram aumento do pico de insulina e Δ max em resposta ao TTG (SALES et al., 2015). A glucose estimula a replicação do DNA em células beta do pâncreas. Além disso, peptídeo inibidor gástrico (GIP) estimula a secreção de insulina pelas células beta. A liberação de GIP é estimulada por carboidratos e lipídios e tem sido associado com a etiologia da obesidade e da hiperinsulinemia, que pode preceder a intolerância à glucose e diabetes de tipo 2 em humanos (revisado por SWENNE, 1992).

Nas fases posteriores da lactação, se observaram concentrações circulantes de insulina mais elevadas. Este achado pode estar diretamente associado à diminuição da produção de leite com o avançar da lactação. Existe uma relação inversa entre a concentração de insulina e a produção de leite durante a lactação. A associação das baixas concentrações de insulina com produção máxima de leite, pode simplesmente ser uma consequência do fato de que, vacas leiteiras de alta produção estão geralmente em um estado de equilíbrio nutricional negativo neste momento (LOMAX et al., 1979). No início da lactação, baixa insulina plasmática está associada ao aumento da gliconeogênese hepática, diminuição da utilização de

glicose pelos tecidos periféricos, aumento da mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo, e, possivelmente, da mobilização de aminoácidos a partir do músculo (BELL, 1995), para suportar a produção de leite.

Apesar das concentrações de insulina circulantes maiores aos 150 DEL, o metabolismo de glicose (taxa de *clearance* da glucose [K%/min], $t_{1/2}$ e AUC) não diferiram das outras fases. Isto indica que a absorção de glicose pelos tecidos pode ter sido reduzida com o aumento do DEL. Em conjunto, estes resultados apontam para uma diminuição da tolerância à glicose e capacidade de resposta à insulina ou a diminuição da absorção de glicose mamária devido à diminuição da produção de leite (MARETT et al., 2015). Produção de leite superior aos 50 e 100 DEL poderia permitir reparação rápida da hiperglicemia na ausência de grandes aumentos nos níveis de insulina. LOMAX et al. (1979) foram os primeiros a demonstrarem diretamente que a menor resposta secretora de insulina em resposta à glicose pode ocorrer em associação com a lactação por si só. HAMMON et al. (2007) relataram uma resposta de insulina inferior à glicose em novilhas leiteiras em comparação com novilhas de corte. A TTG foi realizada pré e pós-parto. Esta diferença foi observada apenas durante a lactação, indicando que o estado metabólico tem um efeito sobre a sensibilidade à insulina.

A resistência à insulina promove diminuição na qualidade dos oócitos em ratos e em mulheres (JUNGHEIM; MOLEY, 2008) e no desenvolvimento embrionário pré-implantação que se manifesta por elevados níveis de morte celular por apoptose em ratos (PINTO; SCHLEIN; MOLEY, 2002). Apesar da falta de estudos relacionados com a resistência à insulina em bovinos, os mecanismos de ação da insulina em ruminantes são semelhantes a outras espécies (SASAKI, 2002), sendo mediada principalmente por alterações na cascata do receptor de insulina (IR), reduzindo a fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS1) e induzindo a atividade reduzida da fosfoinositideo 3-quinase, resultando em menor atividade de IR (SALTIEL; KAHN, 2001). A resistência à insulina, hiperinsulinemia, ou IGF-I aumentado podem interferir com o transporte de glicose no embrião e aumentar a apoptose (SANTOS; CURI; SARTORI, 2008) ou reduzir a qualidade dos oócitos (GONG et al., 2002). Apesar disso, como mencionado anteriormente, não se detectou associação entre DEL ou resistência à insulina e qualidade dos oócitos em nosso estudo. Embora tenha havido um efeito prolongado (> 60 d) da alta ingestão de alimentos na produção *in vitro* de embriões em vacas não lactantes *Bos indicus*,

SALES et al. (2015) não observaram este efeito em vacas holandesas não lactantes. Excesso de AGNE é um dos fatores relacionados com a resistência à insulina (PIRES; PESCARA; GRUMMER; 2007), que pode afetar a qualidade dos oócitos por indução de apoptose e necrose celular, mesmo durante a maturação do cumulus (LEROY et al., 2005). No entanto, um estudo recente conduzido por AARDEMA et al. (2013) mostraram que elevadas concentrações em curto prazo de ácidos graxos livres no fluido folicular não prejudicou a competência de desenvolvimento do oócito, talvez por armazenamento de lipídios nas células do cumulus que serve para evitar a exposição prejudicial do oócito aos ácidos graxos saturados. É provável que a concentração mais elevada de insulina no plasma em resposta à glicose em vacas em lactação mais avançada, além dos mecanismos de proteção de oócitos para concentrações mais elevadas de AGNE no início da lactação, não afetou a qualidade dos oócitos independentemente do DEL. FERREIRA et al. (2011) não observaram diferenças entre vacas em pico de lactação e *repeat breeders* durante o inverno no número de oócitos viáveis, ou taxas de blastocisto. Além disso, estudos prévios realizados por nosso grupo (revisado por SARTORI et al., 2013) sugerem que oócitos de folículos pequenos ou médios (< 8 mm) seriam menos suscetíveis aos efeitos negativos das concentrações elevadas de insulina circulante, considerando que o mesmo pode não ocorrer para oócitos de folículos grandes ou pré-ovulatórios.

3.5 Conclusão

Embora o *clearance* de glicose tenha sido similar entre vacas em diferentes estágios de lactação, as vacas em 150 DEL apresentaram concentrações de insulina plasmática mais elevadas no TTG intravenoso, assim como valores de HOMA-IR mais altos. Estes resultados indicam resistência à insulina com o aumento do DEL. No entanto, a qualidade dos ovócitos provenientes, em sua maioria, de folículos antrais pequenos e médios (< 8 mm), não foi comprometida. Mais pesquisas são necessárias para elucidar os mecanismos que envolvem a resistência à insulina em diferentes estágios de lactação e a fertilidade em vacas leiteiras.

Referências

- AARDEMA, H.; LOLICATO F.; VAN DE LEST, C.H.A.; BROUWERS, J.F.; VAANDRAGER, A.B.; VAN TOL, H.T.A.; ROELEN B.A.J.; VOS P.L.A.M.; J. BERND H.J.; GADELLA B.M. Bovine Cumulus Cells Protect Maturing Oocytes from Increased Fatty Acid Levels by Massive Intracellular Lipid Storage. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 88, p. 15, 2013.
- ADAMIAK, S.J.; MACKIE, K.; WATT, R.G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Impact of nutrition on oocyte quality: Cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 73, p. 918-926, 2005.
- BASTOS, M.R.; RAMOS, A.F.; DRIESSEN, K.; MARTINS, A.C.; RUMPF R.; SARTORI, R. Influence of high dry matter intake on the superovulatory response of crossbred cows. **Ciência Animal Brasileira**, São Paulo, v. 10, p. 1066-1073, 2009.
- BELL, A.W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 2804-2819, 1995.
- BJERRE-HARPOTH, V.; FRIGGENS, N.C.; THORUP, V.M.; LARSEN, T.; DAMGAARD, B.M.; INGVAARTSEN, K.L.; MOYES, K.M.; Metabolic and production profiles of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, p. 2362-2380, 2012.
- 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**, Champaign, v. 91, p. 3363-3371, 2008.
- 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**, London, v. 176, p. 205-217, 2003.
- BUTLER, W.R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, p. 449-457, 2000.
- CARVALHO, P.D.; SOUZA, A.H.; AMUNDSON, M.C.; HACKBART, K.S.; FUENZALIDA, M.J.; HERLIHY, M.M.; AYRES, H.; DRESCH, A.R.; VIEIRA, L. M.; GUENTHER, J. N.; GRUMMER, R.R.; FRICKE, P.M.; SHAVER, R.D.; WILTBANK, M.C. Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 3666-3683, 2014.

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

DE KOSTER, J.D.; OPSOMER, G. Insulin Resistance in Dairy Cows. **Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 29, p. 299, 2013.

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.; P. S. 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**, Champaign, v. 94, p. 2383-2392, 2011.

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, v. 123, p. 419-427, 2002.

GRUMMER, R.R. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy-cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 3882-3896, 1993.

HACKBART, K.S.; CUNHA, P.M.; MEYER, R.K.; WILTBANK, M.C. Effect of Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance on Follicle Development and Ovulation. **Biology of Reproduction**, New York, v. 88, 2013.

HAMMON, H.M.; BELLMANN, O.; VOIGT, J.; SCHNEIDER, F.; KUHN, C. Glucose-dependent insulin response and milk production in heifers within a segregating resource family population. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 3247-3254, 2007.

HOLTENIUS, K.; AGENAS, S.; DELAVAL, C.; CHILLIARD, Y. Effects of feeding intensity during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 883-891, 2003.

JUNGHEIM, E.S.; MOLEY, K.H. The impact of type 1 and type 2 diabetes mellitus on the oocyte and the preimplantation embryo. **Seminars in Reproductive Medicine**, New York, v. 26, p. 186-195, 2008.

KOHJIMA, M.; SUN, Y.; CHAN, L. Increased Food Intake Leads to Obesity and Insulin Resistance in the Tg2576 Alzheimer's Disease Mouse Model. **Endocrinology**, Baltimore, v. 151, p. 1532-1540, 2010.

LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; GUAL, P.; GRE´MEAUX, T.; GONZALEZ, T.; BARRE`S, 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**, London, v. 31, p. 1152-1156, 2003.

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**, Champaign, v. 92, p. 775-782, 2014.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B.; CHRISTOPHE, A.; OPSOMER, G.; KRUIF, A.; GENICOT, G.; VAN SOOM, A. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, Cambridge, v. 130, p. 485-495, 2005.

LEROY, J.L.M.R. 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**, Berlin, v. 43, p. 623-632, 2008a.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; VAN KNEGSEL, A.T.M.; GARCIA-ISPIERTO, I.; BOLS, P.E.J. Nutrient prioritization in dairy cows early postpartum: Mismatch between metabolism and fertility? **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, p. 96-103, 2008b.

LOMAX, M. A.; BAIRD, G.D.; MALLINSON, B.C.; SYMONDS, H.W. Differences between lactating and non-lactating dairy-cows concentration and secretion rate of insulin. **Biochemical Journal**, London, v. 180, p. 281-289, 1979.

MARETT, L.C.; AULDIST, M.J.; GRAINGER, C.; WALES, W.J.; BLACHE, D.; MACMILLAN, K.L.; LEURY, B.J.; Temporal changes in plasma concentrations of hormones and metabolites in pasture-fed dairy cows during extended lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 5017-5026, 2011.

MARETT, L.C.D.; AULDIST, M.J.; MOATE, P.J.; WALES, W.J.; MACMILLAN, K.L.; DUNSHEA, F.R.; LEURY, B.J. Response of plasma glucose, insulin, and nonesterified fatty acids to intravenous glucose tolerance tests in dairy cows during a 670-day lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, p. 179-189, 2015.

MATTHEWS, D.R.; HOSKER, J.R.; RUDENSKI, A.S.; NAYLOR, B.A.; TREACHER, D.F.; TURNER, R.C. Homeostasis model assessment - insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma-glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, Berlin, v. 28, p. 412-419, 1985.

MONTEIRO, P.L.; NASCIMENTO, A.B.; PONTES, G.C.S.; FERNANDES, O.G.; MELO, L.F.; WILTBANK, M.C.; SARTORI, R. Progesterone supplementation after ovulation: Effects on corpus luteum function and on fertility of dairy cows subjected to AI or ET. **Theriogenology**, Stoneham, v. 84, p. 1215-1224, 2015.

NICOD, N.; BESSE, C.; TAPPY, L. Metabolic adaptations to dexamethasone-induced insulin resistance in healthy volunteers. **Diabetes**, New York, v. 51, p. A355-A355, 2002.

NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. **7th rev. ed**, Washington, p. 381 , 2001.

OPSOMER, G.; WENSING, T.; LAEVEN, H.; CORYN, M.; KRUIF, A. Insulin resistance: the link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy cows? **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 56, p. 211-222, 1999.

PINTO, A.B.; SCHLEIN, A.L.; MOLEY, K.H. Preimplantation exposure to high insulin-like growth factor I concentrations results in increased resorption rates in vivo. **Human Reproduction**, Oxford, v. 17, p. 457-462, 2002.

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**, Champaign, v. 90, p. 4635-4642, 2007.

PIRES, J.A.A.; SOUZA, A.H.; GRUMMER, R.R. Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 2735-2744, Jun 2007.

RAVUSSIN, E.; SMITH, S.R. Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. **Lipids and Insulin Resistance: the Role of Fatty Acid Metabolism and Fuel Partitioning**, London, v. 967, p. 363-378, 2002.

RHEE, M.S. Dexamethasone treatment causes resistance to insulin-stimulated cellular potassium uptake in the rat. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, Bethesda, v. 287, p. C1229-C1237, 2004.

SALES, J.N.S.; IGUMA, L.T.; BATISTA, R.I.T.P.; QUINTÃO, 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**, Champaign, v. 98, p. 3086-3099, 2015.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, London, v. 414, p. 799-806, 2001.

SANTOS, J.E.P.; CURI, R.L.A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, p. 88-97, 2008.

SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M.M.; SURJUS, R.S.; MELO, L.F.; PRATA, A.B.; ISHIGURO, M.; BASTOS, M.R.; NASCIMENTO, A.B. Metabolic hormones and reproductive function in cattle. **Animal Reproduction**, Amsterdam, v. 10, p. 199-205, 2013.

SASAKI, S.I. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. **Animal Science Journal**, Champaign, v. 73, p. 423-433, 2002.

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**, Porto Alegre, v. 38, p. s545-s557, 2010.

STEVENSON, J.L.; DALTON, J.C.; SANTOS, J.E.P.; SARTORI, R.; AHMADZADEH, A.; CHEBEL, R.C. Effect of synchronization protocols on follicular development and estradiol and progesterone concentrations of dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, p. 3045-3056, 2008.

SWENNE, I. Pancreatic beta-cell growth and diabetes mellitus. **Diabetologia**, Berlin, v. 35, p. 193-201, 1992.

VIANA, J.H.M.; PALHAO, M.P.; SIQUEIRA, L.G.B.; FONSECA, J.F.; CAMARGO, L.S.A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, Stoneham, v. 73, p. 966-972, 2010.

WALSH, S.W.; WILLIAMS, E.J.; EVANS, A.C.O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p. 127-138, 2011.

WILTBANK, M.C.; GARCIA-GUERRA, A.; CARVALHO, P.D.; HACKBART, K.S.; R.W. BENDER, R.W.; SOUZA, A.H.; TOLEDO, M.Z.; BAEZ, G.M.; SURJUS, R.S.; SARTORI, R. Effects of energy and protein nutrition in the dam on embryonic development. **Animal Reproduction**, Berlin, v. 11, p. 168-182, 2014.

4 EFEITO DO AUMENTO DE INSULINA CIRCULANTE NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E LUTEAL EM VACAS HOLANDESAS

Resumo

O objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que o aumento de insulina circulante durante os períodos de pré e pós desvio folicular aumenta o desenvolvimento inicial e final do folículo, bem como do corpo lúteo (CL). Por induzir a ovulação de um folículo maior, o CL resultante de vacas com alta insulina circulante também será maior e mais esteroidogênico, refletindo em maiores concentrações circulantes de progesterona (P4). Foram utilizadas 16 vacas holandesas não lactantes e não gestantes, cujos ciclos estrais foram sincronizados e o cio observado (Dia 0). Nos dias 10 e 11 $\pm$ 2 do ciclo estral, todos os folículos > 4 mm foram aspirados para a sincronização da emergência de uma nova onda de crescimento folicular. O segundo dia de aspiração foi considerado o D1 para o experimento, quando deu-se início aos tratamentos. Para isto, as vacas foram distribuídas em tratamentos que consistiram de água (Controle) ou propilenoglicol (PPG) fornecidos v.o. em quatro doses diárias de 300 mL, a cada 6 horas, por 3 dias consecutivos (D1 ao D3; período de pré desvio folicular), e por mais 3 dias consecutivos (D5 a D7; período de pós desvio folicular). O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino em arranjo fatorial 2x2. Desta forma, formaram-se quatro grupos experimentais: Grupo CC = água pré e pós desvio folicular (n = 16); Grupo CP = água e PPG pré e pós desvio folicular, respectivamente (n = 16); Grupo PC = PPG e água pré e pós desvio folicular, respectivamente (n = 16) e Grupo PP = PPG pré e pós desvio folicular (n = 16). Colheitas de sangue foram realizadas 0 (imediatamente antes), 15, 30, 60 e 120 minutos após fornecimento do PPG para dosagem de insulina e glicose. E, diariamente, para dosagens de P4. Exames ultrassonográficos ovarianos foram realizados diariamente para avaliação da dinâmica folicular e luteal. A análise estatística foi realizada pelos procedimentos MIXED do SAS. As concentrações plasmáticas de insulina e glicose foram maiores para os grupos que receberam PPG em comparação aos controles. No entanto, não houve efeito do aumento de insulina ($P > 0,05$) sobre a taxa de crescimento folicular pré desvio e pós desvio, tamanho de folículo ovulatório, desenvolvimento do CL e concentrações circulantes de P4. O aumento transitório de insulina circulante durante momentos restritos nos períodos de pré e pós desvio não interferiu no desenvolvimento folicular, luteal e concentrações plasmáticas de P4.

Palavras-chave: Propilenoglicol; Ovário; Progesterona; Bovino leiteiro

Abstract

The aim of this study was to test the hypothesis that increased circulating insulin during the pre and post deviation period would increase the initial and final follicle development and corpus luteum (CL) volume. Moreover, we hypothesized that the CL resulting from follicles of cows with high circulating insulin would also be larger and more steroidogenic, reflected in higher circulating concentrations of progesterone (P4). Sixteen non-lactating and nonpregnant Holstein cows were used. The estrous cycles were synchronized and estrus (Day 0) was observed. On 10 and 11 $\pm$ 2 of the estrous cycle, all follicles > 4 mm were aspirated for synchronizing the

emergence of a new follicular wave. The second day of aspiration was considered D1 of the experiment, when treatments began. For this, cows were divided into treatments that consisted of water (Control; C) or propylene glycol (PPG) provided orally in four daily doses of 300 mL every 6 hours for 3 consecutive days (D1 to D3, pre follicle deviation period), and another 3 consecutive days (D5 to D7; after follicle deviation period). The experimental design was a Latin square in a 2x2 factorial arrangement. Thus, four groups were formed: 1) Group CC = water pre and post follicle deviation ($n = 16$); 2) Group CP = water pre and PPG post follicle deviation, respectively ($n = 16$); 3) Group PC = PPG pre and water post follicle deviation, respectively ($n = 16$); and 4) Group PP = PPG pre and post follicle deviation ($n = 16$). Blood samples were taken 0 (immediately before), 15, 30, 60 and 120 minutes after PPG for circulating insulin and glucose, and daily for P4 measurement. Ovarian ultrasonography examinations were performed daily for evaluation of follicular and luteal dynamics. Statistical analysis was performed by the MIXED procedures of SAS. Plasma insulin and glucose concentrations were higher in the groups receiving PPG compared to controls. However, insulin increase did not affect ($P > 0.05$) follicle growth pre and post ovulatory follicle size, CL volume and circulating concentrations of P4. The transient increase in circulating insulin either before or after the expected time of deviation did not affect follicle development, luteal volume or plasma concentrations of P4.

Keywords: Propylene glycol, Ovary, Progesterone, Dairy cattle

4.1 Introdução

A nutrição é um dos principais fatores que influenciam as funções reprodutivas em bovinos. Hormônio de crescimento, IGF-I e insulina são hormônios que desempenham papel chave na reprodução por potencializarem a ação de gonadotrofinas nas células esteroideogênicas ovarianas (WEBB et al., 2004).

Insulina estimula a proliferação e função de células ovarianas, agindo sinergicamente com FSH na diferenciação das células da granulosa (SPICER, ALPIZAR; ECHTERNKAMP, 1993). Além disto, estimula a síntese luteal de P4 (SPICER; ECHTERNKAMP, 1995).

Os efeitos benéficos de dietas de alta energia sobre a reprodução em bovinos, são mediados em parte, pela maior concentração de hormônios e metabolitos como insulina, IGF-I e glicose (WETTEMANN et al., 2003). Da mesma forma, compostos glucogênicos também podem ser utilizados com este mesmo propósito (BUTLER; PELTON; BUTLER, 2006; RIZOS et al., 2008). De fato, administração de propilenoglicol (PPG) produziu maior percentagem molar de propionato no rúmen e provocou maior resposta à insulina em comparação ao amido na dieta (SPICER; ALPIZAR; ECHTERNKAMP, 1993).

O PPG é um composto orgânico que quando fornecido via oral é parcialmente metabolizado à propionato no rúmen. No entanto, grande parte escapa da fermentação ruminal, sendo convertido em glicose no fígado. O propionato é transportado ao fígado via sistema porta e convertido à piruvato e glicose (RIZOS et al., 2008). Além de estimular a secreção de insulina pelo aumento de glicose circulante, o PPG e seus intermediários também exercem esta função. A administração oral de PPG aumenta as concentrações circulantes de insulina em 200-400% dentro de 30 minutos após a ingestão, indicando que PPG é absorvido rapidamente (NIELSEN; INGVARTSEN, 2004).

O aumento das concentrações plasmáticas de insulina por meio do fornecimento de PPG está associado a resultados positivos na reprodução, como menor intervalo parto-primeira ovulação em vacas lactantes (MIYOSHI; PATE; PALMQUIST, 2001; BUTLER; PELTON; BUTLER, 2006).

No entanto, cabe-se ressaltar que grande parte dos estudos utilizou vacas lactantes no pós-parto e forneceu PPG por longo tempo. São poucos os dados na literatura referentes aos efeitos de insulina circulante na função ovariana por meio do fornecimento de PPG em curto prazo e em momentos estratégicos do ciclo estral.

Assim, o objetivo do presente estudo foi testar a hipótese de que o aumento da insulina circulante por meio do fornecimento de PPG estimula o desenvolvimento folicular inicial e final, bem como do corpo lúteo (CL). Além disso, por induzir à ovulação de um folículo maior, o CL resultante de vacas com alta insulina circulante também é maior e mais esteroidogênico, refletindo em maiores concentrações circulantes de P4.

4.2 Materiais e Métodos

O estudo foi realizado nas instalações do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo, durante o período de março a junho de 2014. O experimento foi conduzido de acordo com os procedimentos experimentais previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da ESALQ (Protocolo n. 2014-20).

4.2.1 Animais e manejo alimentar

Foram utilizadas 16 vacas holandesas não lactantes e não gestantes, com peso e escore de condição corporal (ECC; média $\pm$ DP) de $679,7 \pm 73,6$ kg e $3,25 \pm 0,6$, respectivamente.

As vacas foram alimentadas com concentrado composto por polpa cítrica, milho, soja, uréia e mistura mineral com feno pré-secado de *Tifton 85* como fonte de volumoso *ad libitum*. As vacas também receberam mistura mineral comercial (Nutramix, Chapecó, SC, Brasil) e água *ad libitum*. A dieta foi formulada para atender às demandas de manutenção para vacas não lactantes (NRC, 2001; Tabela 4.1). O concentrado foi fornecido individualmente, quatro vezes ao dia (0:15 h, 6:15 h, 12:15 h e 18:15 h), em sistema de canis. As vacas foram pesadas antes e ao término do experimento para confirmar a manutenção do peso corpóreo.

Tabela 4.1 - Ingredientes e composição química da dieta experimental

Item		
Ingrediente (% da MS)		
Feno pré secado <i>Tifton 85</i>	74	
Polpa cítrica	9,5	
Milho moído	4,5	
Farelo de soja	9,5	
Uréia	0,9	
Mistura mineral	1,4	
Composição química (%MS)	Feno pré secado <i>Tifton 85</i>	Concentrado
PB	10,4	13,4
FDN	64,2	-
Extrato etéreo	2,0	2,6
NDT	54,3	72,0

4.2.2 Tratamentos e avaliação ultrassonográfica

As vacas tiveram o ciclo estral sincronizado por meio da utilização de um dispositivo intravaginal de 1,9 g de P4 (CIDR®; Zoetis, Brasil) e uma injeção intramuscular (i.m.) de 0,05 mg de GnRH (Diacetato de gonadorelina; Cystorelin®, Merial, Canadá) no dia -11 do protocolo (dia aleatório do ciclo estral). No dia -4, foram administrados 25 mg i.m. de PFG₂α (Dinoprost trometamina; Lutalyse®, Zoetis, Brasil). No dia -2, o dispositivo intravaginal de P4 foi removido e os animais

receberam a aplicação i.m. de 25 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Foi colocado um dispositivo auxiliar para detecção de estro (Estrofect, IVP do Brasil), que foi avaliado duas vezes ao dia.

Exames ultrassonográficos ovarianos foram realizados diariamente para confirmação da ovulação (aparelho de ultrassom com transdutor linear trans-retal de 7,5 MHz, Mindray DP 2200, China). O dia da ovulação foi considerado o dia 1 do ciclo estral subsequente. Nos dias 10 e 11 $\pm$ 2 do ciclo estral, todos os folículos > 4 mm foram aspirados, por via transvaginal para a sincronização da emergência de uma nova onda de crescimento folicular. O segundo dia de aspiração foi para garantir a eficiente ablação de potenciais folículos ativos residuais e foi considerado o D1 para o experimento propriamente dito.

No D1, deu-se início aos tratamentos. Para isto, as vacas foram distribuídas de acordo com peso e ECC, em delineamento quadrado latino e arranjo fatorial 2x2, em quatro grupos experimentais: CC = água pré e pós desvio folicular (n = 16); CP = água e PPG pré e pós desvio folicular, respectivamente (n = 16); PC = PPG e água pré e pós desvio folicular, respectivamente (n=16) e PP = PPG pré e pós desvio folicular (n=16). Os tratamentos consistiram de água (Controle) ou PPG (Propilenoglicol PA, Pharmasy, Piracicaba) fornecidos v.o. em quatro doses diárias (0h, 6h, 12h e 18h) de 300 mL cada, por 3 dias consecutivos (D1 ao D3; período de pré desvio folicular), e depois por mais 3 dias consecutivos (D5 a D7; período pós desvio folicular). A forma de administração e dose de PPG foram escolhidas baseando-se em estudos prévios (CHRISTENSEN et al., 1997)

No D5 e D6 foram administrados 25 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ para indução de luteólise, posterior ovulação e formação de um novo CL que foi monitorado por 10 dias (Figura 4.1). Os ovários das vacas foram mapeados diariamente por ultrassonografia para avaliação da dinâmica folicular e luteal, conforme descrito por SARTORI, ROSA E WILTBANK, (2002).

4.2.3 Colheitas de sangue e análises laboratoriais

Para avaliar o perfil plasmático de insulina e glicose, no D1 e D5 foram colhidas amostras de sangue, imediatamente antes (0), 15, 30, 60 e 120 minutos após o fornecimento do PPG ou água, nos quatro momentos de fornecimento ao longo do dia (6,12,18 e 24 horas). Para avaliação das concentrações circulantes de P4, amostras foram colhidas duas vezes ao dia, do D1 ao D7, imediatamente antes

do fornecimento de PG e antes do fornecimento de concentrado até o final das avaliações, ou seja, no dia 10 do novo ciclo estral.

As colheitas de sangue foram realizadas por punção da veia jugular em tubos heparinizados (Vacutainer, Becton-Dickinson Company, EUA) de 10 mL para P4 e insulina e de 4 mL contendo fluoreto de sódio para glicose. Em seguida, o sangue foi mantido em gelo para o transporte até o laboratório, onde foi centrifugado a 1700 x g por 15 min para obtenção do plasma, que foi armazenado a -20 °C para as mensurações posteriores.

As concentrações circulantes de insulina ($\mu\text{UI/mL}$) foram mensuradas no Laboratório de Endocrinologia Animal da UNESP-Araçatuba, por meio de kit comercial de radioimunoensaio (RIE) para insulina suína (Millipore Corporation, Billerica, MA) que apresenta 90% de especificidade para insulina bovina. Para dosagem de P4 (ng/mL) utilizou-se RIE (ImmuChemTM Progesterone CT, ICN Pharmaceuticals, CA, USA). As concentrações de glicose foram, determinadas pelo método enzimático colorimétrico utilizando-se o kit comercial Glicose Liquiform (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) no Laboratório de Metabolismo Animal da Esalq-USP. Os coeficientes de variação (CV) Intra e inter-ensaio foram de 1,7% e 6,16% para insulina, 2,5% e 1,7% para glicose e 7,7% e 5,3% para P4, respectivamente.

Na análise dos dados de glicose e insulina, foram testados os efeitos dos fatores (PPG pré e pós desvio folicular) e suas interações. Quando não significativo ($P > 0,05$), foi testado o efeito principal de tratamentos (Controle e PPG). Após testar-se o efeito de dia (D1 e D5), assim como a interação (Dia x PPG pré e pós desvio folicular), não apresentando significância, as médias dos respectivos dias foram agrupadas. As médias foram comparadas por meio do teste Pdiff e diferenças com $P \leq 0,05$ foram considerados significativas e aquelas com $0,05 < P \leq 0,10$ foram consideradas tendências.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Concentrações circulantes de insulina e glicose

As concentrações basais (min 0) de insulina não diferiram ($P > 0,05$) entre grupos para nenhuma das horas em que os tratamentos foram aplicados (Controle vs. PPG: 6 horas: $10,6 \pm 2,4$ vs. $12,9 \pm 2,4$ $\mu\text{UI/mL}$; 12 horas: $8,8 \pm 2,3$ vs. $11,5 \pm 2,4$ $\mu\text{UI/mL}$; 18 horas: $10,7 \pm 2,5$ vs. $12,8 \pm 2,4$ $\mu\text{UI/mL}$; 24 horas: $15,3 \pm 2,5$ vs. $17,5 \pm 2,7$ $\mu\text{UI/mL}$).

A dose de PPG fornecida foi eficiente em aumentar as concentrações plasmáticas de insulina rapidamente logo nos primeiros 15 minutos, sendo o pico alcançado aos 30 minutos após fornecimento de PPG (Figura 4.2), corroborando estudos prévios (STUDER et al., 1993; GRUMMER et al., 1994). Isto indica que o PPG é rapidamente absorvido pelo rúmen (NIELSEN et al., 2008) e convertido à propionato, uma vez que este estimula a secreção de insulina pelo pâncreas (BROCKMAN, 1982). Além disto, o PPG por si só, bem como seus intermediários, lactato e piruvato, também estimulam a secreção de insulina (NIELSEN; INGVARTSEN, 2004).

Foram observados efeitos de tempo e tratamento ($P < 0,001$), assim como da interação ($P = 0,04$) sobre as concentrações circulantes de insulina, de forma que se mantiveram elevadas até 120 minutos após o fornecimento de PPG, às 6 e 12 horas (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Concentrações plasmáticas de insulina em vacas holandesas após o fornecimento v.o. de 300 mL de propilenoglicol (PPG; n = 16) ou água (Controle; n = 16) em quatro doses diárias: 6 horas (A), 12 horas (B), 18 horas (C) e 24 horas (D). Foi observado efeito de tratamento ($P < 0,001$) e tempo ($P < 0,001$). (*) Médias cuja a interação tratamento x hora x min diferem ($P = 0,04$). Os dados estão apresentados como média dos quadrados mínimos $\pm$ EP

Para as concentrações plasmáticas de glicose, foram observados efeitos de tratamento ($P = 0,04$), tempo ($P < 0,001$), porém nenhum efeito foi observado para a interação tempo x tratamento ($P = 0,68$; Figura 4.3). As médias gerais de glicose circulante para o grupo controle e PPG foram de $67,1 \pm 1,3$ e $71,0 \pm 1,3$ mg/dL, respectivamente. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que o PPG é metabolizado à propionato no rúmen que posteriormente é convertido à glicose no fígado via gliconeogênese (NIELSEN; INGVARTSEN, 2004). Estudos prévios também demonstraram que o fornecimento de PPG via oral elevou a glicose plasmática (STUDER et al., 1993; GRUMMER et al., 1994; RIZOS et al., 2008). No

entanto, o perfil da concentração de glicose circulante em resposta ao PPG pode não ser tão expressivo quanto ao da insulina (CHRISTENSEN et al., 1997; MIYOSHI; PATE; PALMQUIST, 2001), uma vez que a elevação nas concentrações plasmáticas de insulina pode contribuir para manter a glicose plasmática constante.

Figura 4.3 - Concentrações plasmáticas de glicose em vacas holandesas após o fornecimento v.o. de 300 mL de propilenoglicol (PPG; n = 16) ou água (Controle; n = 16) em quatro doses diárias: 6 horas (A), 12 horas (B), 18 horas (C) e 24 horas (D). Foi observado efeito de tratamento ($P = 0,04$), e tempo ($P < 0,001$). Não houve interação tratamento x hora x min ($P = 0,68$). Os dados estão apresentados como média dos quadrados mínimos $\pm$ EP

4.3.2 Dinâmica folicular

Para todos os grupos experimentais, o folículo dominante atingiu tamanho aproximado de 8,5 mm (GINTHER, 2000) no dia previsto para o desvio folicular (D4 da onda folicular e D14 do ciclo estral; CC: $9,5 \pm 0,4$; CP: $9,3 \pm 0,5$; PC: $9,0 \pm 0,5$; PP: $8,6 \pm 0,5$; $P = 0,65$), conforme o delineamento proposto.

Não observou-se diferença entre tratamentos ($P = 0,65$) para o desenvolvimento do folículo dominante (mm) durante os períodos pré desvio folicular ou pós desvio folicular (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Desenvolvimento em diâmetro (mm) do folículo dominante de vacas holandesas não lactantes. CC = água pré e pós desvio folicular ($n = 16$); CP = água e PPG pré e pós desvio folicular ($n = 16$), respectivamente; PC = PPG e água pré e pós desvio folicular ($n = 16$), respectivamente; PP = PPG pré e pós desvio folicular ($n = 16$). Os dias representados correspondem do D2 ao D9 do período experimental, ou seja, D12 ao D19 da onda de crescimento folicular. PPG pré-desvio ($P = 0,20$); PPG pós desvio ($P = 0,85$); Interação PPG pré x PPG pós desvio ($P = 0,67$); Interação PPG pré x PPG pós desvio x dia ($P = 0,65$). Os dados estão apresentados como média dos quadrados mínimos $\pm$ EP

Da mesma forma, não houve efeito do PPG sobre a taxa de crescimento do folículo dominante (mm/dia) no período pré desvio ($P = 0,76$) e pós desvio folicular ($P = 0,43$). O tamanho máximo do folículo ovulatório também não foi influenciado pelos tratamentos ($P = 0,61$; Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Resultados de dinâmica folicular de vacas holandesas não lactantes tratadas com propilenoglicol (PPG) pré e/ou pós desvio folicular

	Tratamento ¹				P ²		
	CC (n = 16)	CP (n = 16)	PC (n = 16)	PP (n = 16)	PPG pré desvio	PPG pós desvio	PPG pré x PPG pós desvio
Crescimento folicular pré desvio (mm/dia)	1,5 ± 0,14	1,3 ± 0,15	1,5 ± 0,14	1,4 ± 0,15	0,59	0,23	0,76
Crescimento folicular pós desvio (mm/dia)	1,2 ± 0,13	1,4 ± 0,14	1,4 ± 0,13	1,4 ± 0,13	0,45	0,29	0,43
Folículo ovulatório (mm)	15,5 ± 0,56	16,1 ± 0,55	15,6 ± 0,52	15,6 ± 0,54	0,68	0,53	0,61

¹CC = Água pré e pós desvio folicular; CP = água e PPG pré e pós desvio folicular, respectivamente; PC = PPG e água pré e pós desvio folicular, respectivamente; PP = PPG pré e pós desvio folicular. ² Valores de P: efeito do fornecimento de PPG pré ou pós desvio folicular e da interação destes fatores. Os dados estão apresentados como média dos quadrados mínimos ± EP

Estudos *in vitro* demonstraram que a insulina estimula a proliferação de células da granulosa (GONG et al., 1993) e da teca (STEWART et al., 1995), assim como a esteroidogênese (GONG et al., 1994). SILVA; PRICE (2002) observaram que concentrações de insulina em torno de 100 ng/mL estimularam a expressão de mRNA e a atividade da P450 aromatase, assim como aumentaram a secreção de estradiol. Trabalhos *in vivo* que demonstram efeitos estimuladores semelhantes são em menor número. Isto provavelmente é devido, ao menos em parte, à hipoglicemia quando a insulina é administrada sem tratamento concomitante com glicose. O efeito neuroendócrino contra regulatório associado à hipoglicemia pode substituir quaisquer efeitos benéficos da insulina (BUTLER; PELTON; BUTLER, 2004). De

fato, a biodisponibilidade de glicose, influencia tanto o centro tônico quanto o pré-ovulatório de liberação de GnRH, modulando indiretamente a liberação de LH. Como citado por DISKIN et al. (2003), animais hipoglicêmicos apresentaram atraso na liberação de LH. No entanto, esta liberação induzida por estradiol foi reestabelecida após infusão de glicose. No presente estudo, a ausência de efeito de tratamento não pode ser atribuída à hipoglicemia, uma vez que o fornecimento de PPG elevou as concentrações circulantes de glicose (Figura 4.3)

A atividade ovariana pode ser influenciada por alterações agudas na alimentação, o que está diretamente associado com alterações nas concentrações circulantes de hormônios metabólicos, como a insulina e IGF-I (WEBB et al., 2004). De acordo com MARTIN; RODGER; BLACHE (2004), as funções reprodutivas podem ser influenciadas positivamente por incrementos nutricionais em curto prazo (menos de 10 dias), sem qualquer mudança detectável de peso e ECC. Estes “efeitos agudos” podem ser obtidos por meio do aumento de energia da dieta com a inclusão de grãos, infusão de glicose, insulina, assim como compostos gliconeogênicos (LETELIER et al., 2008). Muitos estudos que demonstram os efeitos benéficos da insulina por meio de dietas com alta inclusão de concentrados o fazem utilizando-se vacas leiteiras no pós-parto (GONG et al., 2002). Neste período, a menor fertilidade tem sido associada à menor concentração circulante de insulina e IGF-I (WEBB et al., 2004). A insulina atua como sinalizador do *status* energético para o sistema nervoso central, estimulando a liberação de GnRH e a pulsatilidade de LH (BUTLER et al., 2003). Animais tratados com insulina apresentam maior número de folículos responsivos a gonadotrofinas e taxa de ovulação (COX et al., 1987)

Em estudo citado por SARTORI; BARROS (2011), novilhas Nelore alimentadas com dieta para exceder em 70% as exigências de manutenção apresentaram maior concentração de insulina circulante e, maior taxa de crescimento do folículo dominante, diâmetro do folículo ovulatório e tamanho máximo do CL. No entanto, não foram detectadas diferenças nas concentrações circulante de P4 e pico de estradiol pré-ovulatório, quando comparado a novilhas alimentadas com dieta abaixo das exigências de manutenção.

Além de dietas de alta densidade energética, compostos gliconeogênicos também podem ser utilizados para aumentar as concentrações circulantes de insulina e obter efeitos na reprodução. Estudos prévios mostraram que o

fornecimento de PPG por longos períodos diminuiu os dias para primeira ovulação no pós-parto (MIYOSHI; PATE; PALMQUIST, 2001; CHAGAS et al., 2007). No entanto, de acordo com RIZOS et al. (2008) a dinâmica ovariana, bem como a primeira ovulação pós-parto não foram influenciadas pelo tratamento com PPG. BUTLER; PELTON; BUTLER (2006) embora tenham relatado aumento de insulina circulante, não observaram diferença no tamanho máximo do folículo ovulatório no d25, após fornecerem diariamente, 500 mL de PPG ou água do d-10 ao d25 pós-parto em vacas lactantes.

Corroborando nossos resultados, UMEKI; TANAKA; KAMOMAE (2012) avaliaram a função ovariana de novilhas holandesas que receberam diariamente 250 mL de PPG do D6 ao D8 pós ovulação e 500 mL do D10 ao D12. Estes autores não observaram nenhum efeito de tratamento sobre o crescimento folicular e desenvolvimento luteal.

Cabe ressaltar que, grande parte dos estudos avaliando o efeito de PPG sobre parâmetros reprodutivos, sobretudo dinâmica folicular, utilizou vacas em lactação no pós parto. Assim, diferentes condições fisiológicas (vacas lactantes vs. vacas não lactantes) e/ou o tempo de aplicação do tratamento (longo vs. curto prazo), podem em parte, justificar os resultados contraditórios.

No presente estudo, a ausência de efeito de tratamento sobre o desenvolvimento folicular deve-se provavelmente, ao aumento agudo, porém transitório das concentrações de insulina plasmática em períodos restritos de pré e pós desvio folicular.

4.3.3 Dinâmica luteal e concentrações circulantes de P4

Os efeitos diretos e indiretos do aumento de insulina circulante sobre o desenvolvimento e função luteal foram acessados. Para isto, durante o fornecimento do PPG, avaliou-se a dinâmica e concentração circulante de P4. Posteriormente, as mesmas avaliações foram realizadas em um novo CL, proveniente da ovulação de folículo que se desenvolveu em vacas tratadas quatro vezes ao dia com PPG v.o.

Não foi observado efeito de tratamento em nenhum dos momentos avaliados sobre o desenvolvimento em volume do CL ($P = 0,52$; Figura 3.5).

Figura 4.5-Desenvolvimento em volume (mm^3) do corpo lúteo (CL) de vacas holandesas não lactantes. CC = água pré e pós desvio folicular ($n = 16$); CP = água e PPG pré e pós desvio folicular, respectivamente ($n = 16$); PC = PPG e água pré e pós desvio folicular, respectivamente ($n = 16$); PP = PPG pré e pós desvio folicular ($n = 16$). A- Avaliação do efeito direto do fornecimento de PPG v.o. sobre o desenvolvimento do CL (os dias representados correspondem ao D2, D3, D4 e D5 do período experimental). B- Efeito indireto do fornecimento de PPG v.o. sobre o desenvolvimento do CL, cujo folículo que o originou foi exposto ao estímulo previamente, durante o período pré ou pós desvio folicular (os dias representados correspondem ao D12, D14, D16 e D18 do período experimental). Valores de P: PPG pré-desvio ($P = 0,28$); PPG pós desvio ($P = 0,13$); Interação PPG pré x PPG pós desvio ($P = 0,11$); Interação PPG pré x PPG pós desvio x tempo ($P = 0,72$). Os dados estão apresentados como média dos quadrados mínimos $\pm$ EP

Maior tamanho de folículo ovulatório geralmente está associado ao maior tamanho do CL. VASCONCELOS et al. (2001) relataram que vacas induzidas a ovular folículos menores apresentaram menor tamanho de CL. SARTORI; ROSA; WILTBANK (2002) observaram correlação positiva e significativa entre tamanho do folículo ovulatório e tamanho de folículo em vacas lactantes, secas e novilhas. De fato, neste estudo observou-se correlação positiva entre tamanho (mm^3) do folículo ovulatório e CL no dia 8 ($R = 0,31$; $P = 0,02$) e dia 15 do ciclo estral ($R = 0,27$; $P = 0,04$). Possivelmente, a ausência de efeito de tratamento sobre o crescimento folicular e tamanho de folículo ovulatório (Tabela 3.2) se refletiu também no desenvolvimento do CL (Figura 4.5; Parte B).

Altas concentrações de insulina plasmática podem exercer efeito indireto sobre o CL por meio da influência sobre o desenvolvimento do folículo ovulatório, como também influenciar diretamente o desenvolvimento e função luteal. Estudos *in vitro* mostraram que a adição de insulina ao meio de cultivo de células luteais resultou em aumento na secreção de P4 e maior número de células íntegras por

mais tempo (BAITHALU et al., 2013). De fato, OSHAUGHNESSY; WATHES (1985), já haviam relatado que as características morfológicas e funcionais das células luteais poderiam ser melhor mantidas com adição de insulina ao meio de cultivo *in vitro*.

A insulina é capaz de modular a proteína STAR (MAO et al., 2001), limitante para a velocidade da biossíntese de hormônios esteroides. Além disso, pode modular a esteroidogênese através da ação direta sobre enzimas, como a quebra da cadeia lateral de colesterol pra síntese de P4 (STEIN, BUSSMANN; TESONE, 1995).

A concentração circulante de P4 durante o ciclo estral é resultado do balanço entre a capacidade de síntese de P4 pelo CL e da metabolização desse hormônio, principalmente pelo fígado (WILTBANK et al., 2006). Dentre os fatores que afetam a síntese de P4 pelo CL estão: o número de células luteais, capacidade esteroidogênica e, a habilidade de exportar a P4 (WILTBANK et al., 2012).

Até 80% da P4 secretada pelo CL em ovinos é sintetizada pelas células luteais grandes (NISWENDER et al., 1985). Estas células são derivadas das células da granulosa (SMITH; MCINTUSH; SMITH, 1994) que estão em maior número em folículos com maior taxa de crescimento. MANN (2009) observou alta correlação ($R^2 = 0,64$) entre o peso do CL e concentração plasmática de P4 no dia 5 do ciclo estral, porém não no dia 8 e dia 16. No presente estudo não houve diferença entre tratamentos para concentrações circulantes de P4 em nenhum dos dias do ciclo estral estudados ($P = 0,52$; Figura 4.6), o que pode ser reflexo do tamanho do folículo ovulatório e posterior desenvolvimento do CL, que também foi similar entre tratamentos (Figura 4.5). Além disso, este resultado também indica que não houve efeito direto do aumento de insulina sobre a função do CL.

Figura 4.6 - Concentrações plasmáticas de progesterona (P4) em vacas holandesas. CC = água pré e pós desvio folicular (n = 16); CP = água e PPG pré e pós desvio folicular, respectivamente (n = 16); PC = PPG e água pré e pós desvio folicular, respectivamente (n = 16); PP = PPG pré e pós desvio folicular (n = 16). A- Contração plasmática de P4 no momento em que o CL foi exposto diretamente ou não (CC) a altas concentrações de insulina (os dias representados correspondem ao D1, D3 e D5 do período experimental). B- Contração plasmática de P4 proveniente de CL resultante de foliculo exposto ou não a altas concentrações de insulina durante o período pré ou pós desvio (os dias representados correspondem ao D14, D16 e D18 do período experimental). Valores de P: PPG pré desvio (P = 0,25); PPG pós desvio (P = 0,28); Interação PPG pré x PPG pós desvio (P = 0,78); Interação PPG pré x PPG pós desvio x dia (P = 0,96)

VIEIRA et al. (2010) relataram que vacas não lactantes submetidas à infusão i.v. de glicose por 3 horas apresentaram maiores concentrações de insulina e P4. Posteriormente, COOKE et al. (2012) demonstraram que a infusão de insulina em novilhas de corte aumentou as concentrações plasmáticas de P4, pela redução do catabolismo, somente quando glicose foi suplementada concomitantemente. Estes resultados sugerem um papel modulador da glicose na função da insulina no catabolismo hepático de esteroides e subsequente aumento de P4 circulante (COOKE et al., 2012). LEMLEY et al. (2008) observaram que mesmo com o aumento de 30% de insulina para vacas que recebiam PPG, a expressão de RNAm de enzimas envolvidas no metabolismo hepático de P4 com a CYP2C em vacas recebendo água ou PPG não diferiu entre os tratamentos, mas houve diminuição de 40% na quantidade de RNAm de CYP3A. Porém, neste estudo não foram mensuradas as concentrações circulantes de P4. VIEIRA et al. (2013) relataram que, embora a expressão do mRNA de CYP2C19 e CYP3A4 após o período de infusão

tenha sido reduzida para vacas no tratamento com glicose, nenhum efeito de tratamento foi detectado nas concentrações séricas de P4. Entretanto, MATTOS et al. (2012) não detectaram efeito inibitório da insulina circulante na expressão das enzimas CYP2C e CYP3A em ovelhas quando alimentadas *ad libitum* ou sob restrição alimentar. No presente estudo, o aumento de insulina circulante não alterou as concentrações plasmáticas de P4 (Figura 4.6). Desta forma, ainda não está totalmente elucidado se o aumento nas concentrações de insulina *in vivo* causado pela maior ingestão de energia é suficiente para reduzir a expressão das enzimas hepáticas, reduzindo assim o metabolismo da P4.

4.4 Conclusão

Embora diversos estudos *in vitro* apontem para os efeitos positivos da insulina sobre medidas reprodutivas, outros *in vivo* não demonstram a mesma consistência de resultados. No presente estudo, o fornecimento de PPG v.o. proporcionou a elevação da insulina plasmática. No entanto, este aumento possivelmente por ser agudo e transitório, durante momentos restritos nos períodos de pré e pós desvio folicular, não aumentou o desenvolvimento folicular, luteal e concentrações plasmáticas de P4. Portanto, com o modelo experimental empregado, não foi possível comprovar a hipótese principal deste estudo.

Referências

BAITHALU, R.K.; SINGH, S.K.; GUPTA, C.; RAJA, A.K.; SAXENA, A.; AGARWAL, S.K. Insulin stimulates progesterone secretion to a greater extent than LH in early pregnant buffalo luteal cells cultured in vitro. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 142, n. 3/4, p. 131-136, 2013.

BROCKMAN, R.P. Insulin and glucagon responses in plasma to intraportal infusions of propionate and butyrate in sheep. **Comparative Biochemistry Physiology**, New York, v. 73, p. 237–238, 1982

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**, London, v. 176, p. 205-217, 2003.

BUTLER, S.T.; PELTON, S.H.; BUTLER, W.R. Insulin increases 17 beta-estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 127, p. 537-545, 2004.

BUTLER, S.T.; PELTON, S.H.; BUTLER, W.R. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p. 2938-2951, 2006.

CHAGAS, L.M.; GORE, P.J.S.; MEIER, S.; MACDONALD, K.A.; VERKERKET, G.A. Effect of monopropylene glycol on luteinizing hormone, metabolites, and postpartum anovulatory intervals in primiparous dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 1168-1175, 2007.

CHRISTENSEN, J.O.; GRUMMER, R.R.; RASMUSSEN, F.E.; BERTICS, S.J. Effect of method of delivery of propylene glycol on plasma metabolites of feed-restricted cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 563-568, 1997.

COOKE, R.F.; CAPPELLOZZA, B.I.; REIS, M.M.; BOHNERT, D.W.; VASCONCELOS, J.L.M. Plasma progesterone concentration in beef heifers receiving exogenous glucose, insulin, or bovine somatotropin. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, p. 3266-3273, 2012.

COX, N.M.; STUART, M.J.; ALTHEN, T.G.; BENNETT, W.A.; MILLER, H.W. Enhancement of ovulation rate in gilts by increasing dietary energy and administering insulin during follicular growth. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 64, p. 507-516, 1987.

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

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, p. 61-79, 2000.

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, v. 123, p. 419-427, 2002.

GONG, J.G.; D. MCBRIDE, D.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotropin, insulin-like growth factor-i and insulin on the proliferation of bovine granulosa-cells in-vitro. **Journal of Endocrinology**, London, v. 139, p. 67-75, 1993.

GONG, J.G.; D. MCBRIDE, D.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotropin, insulin-like growth-factor-i and insulin on bovine granulosa-cell steroidogenesis in-vitro. **Journal of Endocrinology**, London, v. 143, p. 157-164, 1994.

GRUMMER, R.R.; WINKLER, J.C.; BERTICS, S.J.; STUDER, V.A. Effect of propylene glycol dosage during feed restriction on metabolites in blood of prepartum Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, p. 3618-3623, 1994.

LEMLEY, C.O.; BUTLER, S.T.; BUTLER, W.R.; WILSON, M.E. Short communication: Insulin alters hepatic progesterone catabolic enzymes cytochrome P4502C and 3A in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, p. 641-645, 2008.

LETELIER, C.; MALLO, F.; ENCINAS, T.; ROS, J.M.; GONZALEZ-BULNES, A. Glucogenic supply increases ovulation rate by modifying follicle recruitment and subsequent development of preovulatory follicles without effects on ghrelin secretion. **Reproduction**, Cambridge, v. 136, p. 65-72, 2008.

MANN, G. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 115, p. 296-299, 2009.

MAO, J.D.; TREACY, B.K.; ALMEIDA, F.R.C.L.; NOVAK, S.; DIXON, W.T.; FOXCROFT, G.R. Feed restriction and insulin treatment affect subsequent luteal function in the immediate postovulatory period in pigs: Progesterone production in vitro and messenger ribonucleic acid expression for key steroidogenic enzymes. **Biology of Reproduction**, New York, v. 64, p. 359-367, 2001.

MARTIN, G.B.; RODGER, J.; BLACHE, D. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. **Reproduction Fertility and Development**, East Melbourne, v. 16, p. 491-501, 2004

MATTOS, F.C.S.Z. **Influência da ingestão alimentar nas concentrações plasmáticas de insulina e progesterona, e na expressão de enzimas hepáticas envolvidas no metabolismo de progesterona em ovelhas pré- púberes**. 2012. 78 p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) , Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu, 2012.

MIYOSHI, S.; PATE, J.; PALMQUIST, D. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, p. 29-43, 2001. ISSN 0378-4320.

NIELSEN, N.I.; INGVARTSEN, K.L. Propylene glycol for dairy cows - A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 115, p. 191-213, 2004.

NISWENDER, G.; SCHWALL, R.H.; FITZ, T.A.; FARIN, C.E.; SAWYER, H.R. Regulation of luteal function in domestic ruminants: new concepts. **Recent Progress Hormonal Research**, London, v. 41, p. 101-151, 1985.

NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th rev. ed, Washington, 2001. 381p.

- OSHAUGHNESSY, P.J.; WATHES, D.C. Characteristics of bovine luteal cells in culture - morphology, proliferation and progesterone secretion in different media and effects of lh, dibutyryl cyclic-amp, antioxidants and insulin. **Journal of Endocrinology**, London, v. 104, p. 355, 1985.
- RIZOS, D.; KENNY, D.A.; GRIFFIN, W.; QUINN, K.M.; DUFFY, P.; MULLIGAN, F.J.; ROCHE, J.F.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. The effect of feeding propylene glycol to dairy cows during the early postpartum period on follicular dynamics and on metabolic parameters related to fertility. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, p. 688-699, 2008.
- SARTORI, R.; BARROS, C. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 124, p. 244-250, 2011.
- SARTORI, R.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 2813-2822, Nov 2002.
- SILVA, J.; PRICE, C. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. **Journal of Endocrinology**, London, v. 174, p. 499-507, 2002.
- SMITH, M.; MCINTUSH, E.; SMITH, G. Mechanisms associated with corpus luteum development. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, p. 1857-1872, 1994.
- SPICER, L.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, p. 1232-1241, 1993.
- SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth-factor system with an emphasis on domestic-animals. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 12, n. 3, p. 223-245, 1995.
- STEIN, P.; BUSSMANN, L.E.; TESONE, M. In-vivo regulation of the steroidogenic activity of rat luteal cells by insulin. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 52, p. 329-335, 1995.
- STEWART, R.; SPICER, L.J.; HAMILTON, T.D.; KEEFER, B.E. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 3719-3731, 1995.
- STUDER, V.A.; GRUMMER, R.R.; BERTICS, S.J.; REYNOLDS, C.K. Effect of prepartum propylene-glycol administration on periparturient fatty liver in dairy-cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 2931-2939, 1993.

UMEKI, A.; TANAKA, T.; KAMOMAE, H. Effects of propylene glycol drenching before and after luteolysis on blood glucose, ovarian steroids and follicular dynamics in heifers. **Animal**, Cambridge, v. 6, p. 300-304, 2012.

VASCONCELOS, J.L.M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H.N.; GUENTHER, I.J.G.; WILTBANK, M.C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, Stoneham, v. 56, p. 307-314, 2001.

VIEIRA, F.V.R.; COOKE, R.F.; ABOIN, A.C.; LIMA, P.
Short communication: Acute but transient increase in serum insulin reduces messenger RNA expression of hepatic enzymes associated with progesterone catabolism in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, p. 1085-1089, 2013.

VIEIRA, F.V.R. ; LOPES, C.N.; CAPPELLOZZA, B.I.; SCARPA, A.B.; COOKE, R.F.; VASCONCELOS, J.L.M. Effects of intravenous glucose infusion and nutritional balance on serum concentrations of nonesterified fatty acids, glucose, insulin, and progesterone in nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 3047-3055, 2010.

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

WETTEMANN, R.; LENTS, C.A.; CICCIONI, N.H.; WHITE, F.J.; RUBIO, I. Nutritional- and suckling-mediated anovulation in beef cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, p. E48-E59, 2003.

WILTBANK, M.C.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GU" MEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, n. 1, p. 17-29, 2006.

WILTBANK, M.C. Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 9, p. 242-259, 2012.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a associação da insulina circulante com a função ovariana e qualidade oocitária em vacas holandesas. Assim, o primeiro experimento foi conduzido para definir qual seria a melhor estratégia de colheita de oócito a ser utilizada no estudo 2. Este, por sua vez, abordou o desenvolvimento de resistência à insulina em vacas leiteiras de alta produção com o avançar da lactação, bem como sua associação com a qualidade oocitária. O último estudo avaliou os efeitos do aumento de insulina circulante sobre a função folicular e luteal.

Três hipóteses foram testadas e os resultados são apresentados a seguir:

1- A produção *in vitro* de embriões em vacas holandesas não lactantes submetidas à OPU, posteriormente ao protocolo de superestimulação folicular similar ao descrito por NIVET et al. (2012) é maior em comparação com a realização da OPU em um dia aleatório do ciclo estral. Esta primeira hipótese não foi comprovada, uma vez que, nas condições do presente estudo, o protocolo de superestimulação folicular com p-FSH, seguido de um período de *coasting* não aumentou a PIVE em vacas holandesas não lactantes. Desta forma, seu uso não foi recomendado no segundo experimento desta tese.

2- Vacas leiteiras de alta produção se tornam cada vez mais resistentes à insulina com o avançar da lactação, e consequentemente, a qualidade do oócito é comprometida. De fato, os resultados do TTG e HOMA-IR indicaram diminuição da sensibilidade à insulina com o aumento do DEL. No entanto, a qualidade dos ovócitos provenientes, em sua maioria, de folículos pequenos, não foi comprometida.

3- O aumento de insulina circulante durante os períodos de pré e pós desvio folicular incrementa o desenvolvimento inicial e final do folículo, bem como do corpo lúteo (CL). E, por induzir a ovulação de um folículo maior, o CL resultante de vacas com alta insulina circulante também é maior e mais esteroideogênico, refletindo em maiores concentrações circulantes de progesterona (P4). O fornecimento de PPG v.o. embora tenha elevado a insulina plasmática durante momentos restritos nos

períodos de pré e pós desvio folicular, não aumentou o desenvolvimento folicular, luteal e concentrações plasmáticas de P4. Provavelmente, o aumento agudo e transitório de insulina plasmática não permitiu a comprovação da hipótese.

Mais pesquisas são necessárias para elucidar os mecanismos envolvidos entre resistência à insulina em diferentes estágios de lactação e fertilidade em vacas leiteiras. Da mesma forma, seria interessante realizar outros estudos *in vivo* que abordem os efeitos do aumento mais prolongado da insulina plasmática em períodos estratégicos pré e pós desvio folicular sobre a função folicular e luteal em bovinos.

Referências

NIVET, A-L.; BUNEL, A.; LABRECQUE, R.; BELANGER, J.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M-A. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. **Reproduction**, Cambridge, v. 143, p. 165-171, 2012.