

ROMULO GERMANO DE REZENDE

**EFEITO DA INFUSÃO RUMINAL DE PROPILENOGLICOL SOBRE OS
PARÂMETROS METABÓLICOS E A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
DE VACAS HOLANDESAS**

São Paulo – SP

2019

ROMULO GERMANO DE REZENDE

**EFEITO DA INFUSÃO RUMINAL DE PROPILENOGLICOL SOBRE OS
PARÂMETROS METABÓLICOS E A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
DE VACAS HOLANDESAS**

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

Departamento: Reprodução Animal

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo – SP

2019

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3831
FMVZ

Rezende, Romulo Germano de
Efeito da infusão ruminal de propilenoglicol sobre os parâmetros metabólicos e a produção *in vitro* de embriões de vacas holandesas / Romulo Germano de Rezende. – 2019.
85 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Vacas holandesas. 2. Glicose. 3. Lactação. 4. Propilenoglicol. 5. OPU. I. Título.

ERRATA

REZENDE, R. G. **Efeito da infusão ruminal de propilenoglicol sobre os parâmetros metabólicos e a produção *in vitro* de embriões de vacas holandesas.** 2019. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Página	Onde se lê	Leia-se
Ficha Catalográfica	85 f.	86 f.

COMISSÃO ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da infusão ruminal de propilenoglicol sobre os parâmetros metabólicos e a produção in vitro de embriões de vacas Holandesas", protocolada sob o CEUA nº 4941140519 (ID 006832), sob a responsabilidade de **Pietro Sampaio Baruselli e equipe; Romulo Germano de Rezende** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 30/07/2019.

We certify that the proposal "Effect of ruminal infusion of propylene glycol on metabolic parameters and in vitro embryo production in Holstein cows", utilizing 356 Bovines (356 females), protocol number CEUA 4941140519 (ID 006832), under the responsibility of **Pietro Sampaio Baruselli and team; Romulo Germano de Rezende** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 07/30/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2018** a **01/2019** Área: **Reprodução Animal**

Origem:	Animais de proprietários	sexo:	Fêmeas	idade:	14 a 72 meses	N:	328
Espécie:	Bovinos			Peso:	300 a 700 kg		
Linhagem:	Holandês						
Origem:	Animais de proprietários	sexo:	Fêmeas	idade:	14 a 72 meses	N:	28
Espécie:	Bovinos			Peso:	300 a 700 kg		
Linhagem:	Holandês						

Local do experimento: O experimento 1 (dosagem de IGF1, Glicose, Insulina, NEFA, BHBA) será realizado na Agência Paulista de Tecnologia no Agronegócio -APTA [Polo Regional Nova Odessa [Fazenda Palmeiras, sendo que os animais utilizados consistirão de 14 vacas em pico de lactação e 14 vacas seca Os animais do experimento 2 serão provenientes da Fazenda Reunidas, Antônio Carlos Pereira e Filhos, quinta colocada no ranking de produção de leite no Brasil, situada no município de Carmo do Rio Claro, no estado de Minas Gerais, com produção média anual de 43.000 kg de leite diários.

São Paulo, 10 de agosto de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FICHA DE AVALIAÇÃO

Autor: REZENDE, Romulo Germano.

Título: Efeito da infusão ruminal de propilenoglicol sobre os parâmetros metabólicos e a produção *in vitro* de embriões de vacas holandesas.

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

São Paulo – SP, ____ de _____ de 2019.

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a): _____.

Instituição: _____. Julgamento: _____.

Prof(a). Dr(a): _____.

Instituição: _____. Julgamento: _____.

Prof(a). Dr(a): _____.

Instituição: _____. Julgamento: _____.

Prof(a). Dr(a): _____.

Instituição: _____. Julgamento: _____.

Prof(a). Dr(a): _____.

Instituição: _____. Julgamento: _____.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que esteve comigo por toda a estrada da vida, sempre me livrando dos males e permitindo que eu pudesse passar por todo o caminho com muita luz. Agradeço a todos os caboclos, pretos velhos, meu anjo da guarda, e todos os seres luz que estiveram comigo a cada km e cada lugar em que dormi.

Agradeço a pessoa mais especial da minha vida, que me gerou no conforto do ventre e me apresentou a vida. Mãe, meu "Botãozinho de Rosa", minha inspiração, que saudade que eu sinto de ficar pertinho de você. Desde que saí de Valadares pra ir fazer Medicina Veterinária, a treze anos atrás, sinto aquela saudade do cuidado de mãe... Você foi a maior incentivadora e patrocinadora de todos os meus estudos, e eu vou ser eternamente grato por isso, e por tantas outras coisas mais... Te amo muito!

Agradeço ao meu Pai Geraldo Majela, por todas as palavras, conversas e tudo que fez para que eu me tornado quem eu sou hoje, você é muito importante pra mim. Te amo muito!

Agradeço aos meus avós Edmundo e Maria ("Vô Dimundo" e Dona Naná), Gircélia e Wilson (Que certeza sempre estão acompanhando os passos de todos da família), meus irmãos Bruno, Felipe e Adriana, e todos os sobrinhos que vocês me deram! Sinto saudades dos meus pequenos que não param de crescer (Ana Clara, Matheus e Fernanda), Amo muito vocês

A toda a minha família, que sempre esteve ao meu lado e viveram momentos épicos na minha infância... A infância na "Roça" (Fazenda Quebra Dedos) foi a maior inspiração pra cursar Medicina Veterinária e trabalhar com pecuária. Vocês todos me deram muita força pra chegar até aqui.

A todos que me apoiaram e tiveram participação efetiva na minha formação acadêmica, Tia Rejani e Tio Zé, nos primeiros passos em Vitória - ES. A tia Joana e Tio Kleber, me ajudando de todas as formas na mudança pra Viçosa - MG. E finalmente a chegada ao estado de SP, que me acolheu e me senti em casa com a Família Ernandes, sem vocês eu jamais estaria aqui hoje! Gratidão por todos

A minha inspiração para trabalhar escolher a Reprodução Animal para trabalhar, Maurício Vieira, conhecer você e seu trabalho com 17 anos me fez escolher essa área apaixonante da pecuária! Agradeço também a Margareth, e Guilherme Gastão, por toda parceria e ensinamentos sou eternamente Grato.

Chegando em SP a vida se transformou completamente, conheci vários anjos que sempre me apoiaram e confiaram em mim.

Primeiro, Professor Pietro Sampaio Baruselli, um exemplo de sabedoria, humildade, e trabalho. Uma das poucas pessoas que conheço que sabe lidar com todas as situações mantendo a calma. Seus exemplos e suas palavras ajudam a desenvolver qualquer pessoa, sou eternamente Grato por ter feito parte do seu time.

Ao meu primeiro amigo do VRA, Rodolfo Mingotti (Badazin), não posso escrever aqui todas as palavras que seria necessárias para expressar minha gratidão. Te amo meu amigo! Haruminha! Sem você, eu e mais um monte de aluno do VRA não estaríamos aqui apresentando a tese/dissertação. Gratidão enorme!

A todos os meus amigos "Pietrinhos" da minha era, agora já "pietrossauros": Manoel, Laís, Karboxy, Bruna, Mili, Brunão, Ralé, Júlia, Agradeço. Aprendi muito com cada um de vocês. As minhas irmãs da vida, Flavia, Lisbek e Bruna morar junto foi uma das melhores fazes da minha vida, vou sentir muita saudade dos nossos jantares, conversas, bebedeiras, e tudo que a gente fazia na "Casinha". Amo vocês.

Agradeço também aos indispensáveis para realizar este trabalho, não foi fácil encontrar parceiros para disponibilizar os animais, mas a turma da Fazenda J-IDA foi a primeira a abraçar a idéia. Thiago Carneiro e Ana Elisa, um casal de veterinários super parceiros que entraram nessa empreitada desde o começo, muito obrigado! A todos os funcionários que trabalharam muito nos tratamentos com PPG pra todas as vacas! Edinho, Preto e toda equipe J-IDA vocês são demais, sempre me lembro com gratidão de tudo que vivi aí.

A Fazenda Reunidas Antônio Carlos Pereira e Filhos, Leo, Leonardo, Tatai e Juninho, muito obrigado por abrirem as portas dessa fazenda que é referência de produção de Leite no

Brasil, aprendi muito com vocês e toda essa equipe. Felipinho, veterinário da nova geração, com gana de aprender e extremamente dedicado ao trabalho! Segue firme aí que você vai voar! Admiro muito seu trabalho!

A todos os "Pietrossauros" da velha guarda! Alex, José Nélio, Robertinha, Everton, Nelsião, Marcio e tantos outros que convivi e aprendi, Agradeço.

Aos que mais marcaram minha vida durante o doutorado, vale a pena dedicar um parágrafo a eles, Bernardo, Flávia, Marcão, Tubarão, Bruna, Laísa, Guilherme (Willy), Amo vocês monstros! Laís, Palú, Lisbek, Mariana, Ana Luiza, gratidão por fazer parte da história de vocês!

A todos os veterinários e fazendas parceiros, na qual estive trabalhando junto de alguma forma, sintam-se abraçados! Sou muito grato por tudo que aprendi convivendo com vocês! A todos os meus alunos dos cursos pelo Brasil e Argentina! Evolui muito com a convivência com vocês! Sou grato.

A todo o time de professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal! Uma família para muitos que vem de longe para viver pelo VRA, ou mesmo que não seja de longe, passa mais tempo lá do que com a família... Vocês foram minha família ao longo desses anos, e sempre vão estar presentes no meu coração. Minha professorinha Mayra! Marcílio, Ricardo, Claudinha, Camila, Carlinha, André, Kiki, Ed, Rubão, Mario... equipe dos bastidores e labs e lendas vivas do VRA: Camila, Fura, Thaís, Loyde, Miguel, Jossi, Diégão, Bob, não vou lembrar de todos mas, sintam-se abraçados FAMÍLIA VRA! Serei eternamente grato!

A pessoa que mais me ajudou nesse último ano em todos os momentos, sempre ajudando, ativamente ou com palavras de conforto e motivação. Uma mulher espetacular que vou levar pra toda a vida. Larissa continue sendo essa pessoa linda que você é... em todos os aspectos, que coração gigante você tem... Te amo!

FAPESP: "processo nº 2015/19563-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)."

CAPES: "O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)"

"Que haja amor, compaixão e paz entre todos os seres do Universo."

Tadashi Kadomoto

RESUMO

REZENDE, Romulo Germano. **Efeito da infusão ruminal de propilenoglicol sobre os parâmetros metabólicos e a produção *in vitro* de embriões de vacas holandesas.** 2019.

86p Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação oral de 500 mL de propilenoglicol (PPG) a cada 12 horas por 5 dias. Foram realizados dois experimentos: Experimento 1: Efeito do tratamento com propilenoglicol sobre as concentrações séricas de glicose, insulina, betahidroxibutirato (BHBA), ácidos graxos não esterificados (NEFA) e fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) em fêmeas da raça Holandesa (*Bos taurus*) e Experimento 2: Efeito do tratamento com propilenoglicol na qualidade dos oócitos e nas taxas de produção *in vitro* de embriões (PIVE) de fêmeas da raça Holandesa (*Bos taurus*). No Experimento 1, foram utilizadas 28 fêmeas de diferentes categorias, divididas em grupo controle (CTL; vacas lactantes, n= 7 e vacas secas, n=7) e grupo PPG (vacas lactantes, n= 7 e vacas secas n= 7). Foram realizadas coletas de sangue uma vez ao dia 90 minutos após o tratamento com PPG durante 5 dias. Ainda, no quinto dia foram realizadas coletas de sangue a cada 45 minutos (0, 45, 90, 135 e 180 minutos) para análises de glicose, insulina, NEFA, BHBA e IGF-1. No Experimento 2, foram utilizadas 323 fêmeas de diferentes categorias divididas em grupo controle CTL (vacas em início de lactação, n= 41; vacas repetidoras de serviço, n= 38, vacas secas, n= 45 e novilhas, n= 39) e grupo PPG (vacas em início de lactação, n= 37, vacas repetidoras de serviço, n = 36, vacas secas, n= 49 e novilhas, n= 38). A OPU foi realizada no dia 0 para ablação folicular e sincronização da emergência da onda e crescimento folicular e, após 5 dias de tratamento com PPG, foi realizada a OPU para a PIVE. Os oócitos aspirados foram maturados durante 24 horas, fecundados com sêmen sexado e cultivados *in vitro*. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *Statistical Analysis System (SAS®)*, *Version 9.4*). No Experimento 1, verificou-se que a suplementação com PPG aumentou a concentração sanguínea de glicose durante os 5 dias de tratamento (P=0,01) e durante os 180 minutos após o último tratamento (P=0,002). Houve interação tratamento*tempo (P=0,02) para as concentrações de glicose durante os 5 dias. Entretanto, não houve interação tratamento*tempo, categoria*tempo e tratamento*categoria para a glicose durante 180 minutos após o último tratamento. A insulina circulante aumentou no grupo suplementado com PPG durante os 5 dias de tratamento (P=0,0001) e durante 180 minutos após o último tratamento (P=0,04). Verificou-se que as vacas em lactação apresentaram maiores concentrações de insulina durante os 5 dias de tratamento (P=0,04) e durante 180 minutos após o último tratamento (P=0,04). Não houve interação tratamento*tempo, categoria*tempo e tratamento*categoria. Não foi observada elevação das concentrações séricas de IGF-1 conforme tratamento (P=0,16) e categoria (0,19), bem como interação tratamento*tempo categoria*tempo e tratamento*categoria durante os 5 dias de tratamento. Entretanto, o IGF-1 aumentou em vacas secas tratadas com PPG durante 180 minutos após o último tratamento (P=0,02). Não foi observada interação tratamento*tempo, categoria*tempo e tratamento*categoria. Notou-se redução nas concentrações sanguíneas de NEFA nos animais tratados com PPG durante os 5 dias de tratamento (P=0,01) e durante os 180 minutos após o último tratamento (P=0,005). Não houve efeito de categoria e de interação tratamento*tempo, categoria*tempo e tratamento*categoria. Para o BHBA, houve

interação tratamento*categoria para as vacas tratadas durante os 5 dias. Entretanto não houve tratamento*tempo e categoria*tempo. Durante os 180 minutos após o último tratamento, o BHBA diminuiu nos animais tratados com PPG ($P < 0,001$). Não houve interação tratamento*tempo, categoria*tempo e tratamento*categoria. No Experimento 2 foi verificado aumento ($P=0,058$) da taxa de desenvolvimento embrionário de novilhas pré púberes suplementadas com PPG (16% vs. 26%). Em vacas secas foi observado aumento ($P=0,058$) na taxa de clivagem nos animais tratados com PPG (44% vs. 47%). Em vacas no início de lactação houve aumento ($P=0,02$) na taxa de blastocistos (18% vs. 37%) e na taxa de clivagem (37% vs 52%) nos animais tratados com PPG. Nessa categoria, houve redução no número de oócitos recuperados por OPU nos animais tratados ($5,66 \pm 0,69$ vs. $3,7 \pm 0,53$; $p = 0,004$), porém, não houve diferença no número de embriões produzidos ($0,98 \pm 0,21$ vs. $1,14 \pm 0,19$; $P= 0,83$). Não foram observadas diferenças na eficiência de produção de embriões em vacas no final de lactação tratadas com PPG. Conclui-se que a suplementação de 500 mL com PPG em fêmeas da raça Holandesa a cada 12 horas por 5 dias, aumentou as concentrações sanguíneas de glicose, insulina e diminui NEFA e BHBA. Entretanto, não se verificou alteração nas concentrações séricas de IGF-1. As taxas de PIVE aumentaram em novilhas, vacas em início de lactação e vacas secas tratadas com PPG. Entretanto, não se verificou efeito na PIVE em vacas no final de lactação.

Palavras-chave: Vacas holandesas; glicose; lactação; propilenoglicol; OPU.

ABSTRACT

REZENDE, Romulo Germano. **Effect of ruminal infusion of propylene glycol on metabolic parameters and *in vitro* embryo production of Holstein cows**

2019. 86p Thesis (PhD in Sciences) - Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

The aim of the present study was to evaluate the effects of oral supplementation of 500 mL of propylene glycol (PPG) every 12 hours for 5 days. Two experiments were performed: Experiment 1: Effect of propylene glycol treatment on serum concentrations of glucose, insulin, betahydroxybutyrate (BHBA), non-esterified fatty acids (NEFA) and insulin-like growth factor (IGF-1) in Holstein (*Bos taurus*) females and Experiment 2: Effect of propylene glycol treatment on oocyte quality and *in vitro* embryo production rates (PIVE) of Holstein (*Bos taurus*) females. In Experiment 1, 28 females of different categories were used, divided into: control group (CTL; lactating cows, n = 7 and dry cows, n = 7) and PPG group (lactating cows, n = 7 and dry cows n = 7). Blood samples were taken once a day 90 minutes after PPG treatment for 5 days. Also, on the fifth day, blood samples were collected every 45 minutes (0, 45, 90, 135 and 180 minutes) for glucose, insulin, NEFA, BHBA and IGF-1 analyzes. In Experiment 2, 323 females of different categories were divided into control group CTL (early lactating cows, n = 41; repeat breeder cows, n = 38, dry cows, n = 45 and heifers, n = 39) and PPG group (early lactating cows, n = 37, service repeating cows, n = 36, dried cows, n = 49 and heifers, n = 38). An OPU was performed on day 0 for follicular ablation, synchronization of wave emergence and follicular growth, and after 5 days of PPG treatment, OPU was performed for the IVEP. Aspirated oocytes were matured for 24 hours, fertilized with sexed semen and cultured *in vitro*. Statistical analyzes were performed using the Statistical Analysis System software (SAS®, Version 9.4). In Experiment 1, it was found that supplementation with PPG increased blood glucose concentration during the 5 days of treatment (P = 0.01) and during the 180 minutes after the last treatment (P = 0.002). There was interaction treatment * time (P = 0.02) for glucose concentrations during the 5 days. However, there was no interaction treatment * time, category * time and treatment * category for glucose 180 minutes after the last treatment. Circulating insulin increased in the PPG supplemented group during the 5 days of treatment (P = 0.0001) and for 180 minutes after the last treatment (P = 0.04). Lactating cows were found to have higher insulin concentrations during the 5 days of treatment (P = 0.04) and for 180 minutes after the last treatment (P = 0.04). There was no interaction treatment * time, category * time and treatment * category. No increase in serum IGF-1 concentrations was observed according to treatment (P = 0.16) and category (0.19), as well as treatment * time category * time and treatment * category interaction during the 5 days of treatment. However, IGF-1 increased in PPG-treated dry cows 180 minutes after the last treatment (P = 0.02). No interaction treatment * time, category * time and treatment * category was observed. Reduction in NEFA blood concentrations was observed in the PPG-treated animals during the 5 days of treatment (P = 0.01) and during the 180 minutes after the last treatment (P = 0.005). There was no effect of category and interaction treatment * time, category * time and treatment * category. For BHBA, there was treatment * category interaction for cows treated during the 5 days. However there was no treatment * time and category * time. During 180 minutes after the last treatment, BHBA decreased in PPG-treated animals (P < 0.001). There was no interaction treatment * time, category * time and treatment * category. Experiment 2 showed an increase (P = 0.058) in the

embryonic development rate of prepubertal heifers supplemented with PPG (16% vs. 26%). In dry cows an increase ($P = 0.058$) on the cleavage rate was observed in PPG treated animals (44% vs. 47%). In early lactating cows there was an increase ($P = 0.02$) on the blastocyst rate (18% vs. 37%) and cleavage rate (37% vs 52%) in PPG-treated animals. In this category, there was a reduction in the number of oocytes recovered by OPU in the treated animals (5.66 ± 0.69 vs. 3.7 ± 0.53 ; $P = 0.004$), but there was no difference in the number of embryos produced (0.98 ± 0.21 vs. 1.14 ± 0.19 ; $P = 0.83$). No differences in embryo production efficiency were observed in late lactating cows treated with PPG. It was concluded that supplementation of 500 mL with PPG in Holstein females every 12 hours for 5 days increased blood glucose, insulin and decreased NEFA and BHBA. However, there was no change in serum IGF-1 concentrations. IVEP rates increased in heifers, early lactating cows and dry cows treated with PPG. However, there was no effect on the IVEP of late lactating cows.

Keywords: Dutch cows; Glucose; Lactation; Propylene glycol; OPU.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1(A) Experimento 1: No início da lactação há maior demanda energética para atender a produção de leite, concomitantemente com a redução no consumo de matéria seca, resultando em BEN. Com isso, verifica-se a mobilização das reservas corporais que promove a perda de ECC. O tratamento com propilenoglicol aumenta o aporte de glicose, que estimula a liberação de insulina e IGF-1. Esses efeitos promovem a redução da mobilização de gordura corporal e, conseqüentemente, redução dos NEFA e BHBA circulantes. (B) Experimento 2: O tratamento com propilenoglicol proporciona aumento do aporte energético e tem efeito positivo na competência oocitária, no número folículos e de oócitos viáveis aspirados e, conseqüentemente, maior eficiência na PIVE. Para confirmar as hipóteses levantadas será avaliado o efeito do tratamento com propilenoglicol em diferentes categorias de animais lactantes (vacas em início e final de lactação) e não lactantes (novilhas e vacas secas).	25
Figura 2- Vacas no terço inicial da lactação com produção média de 30,5 L de leite...	35
Figura 3 - Vacas múltíparas secas, observa-se o alto ECC.	35
Figura 4 – Delineamento experimental e perfil metabólico após infusão ruminal de PPG.	36
Figura 5 – Vacas recebendo infusão ruminal de 500 mL de propilenoglicol, utilizando sonda de borracha , a fim de evitar menor incômodo aos animais.	38
Figura 6 – Produção in vitro de embriões de fêmeas da raça Holandesa após infusão ruminal de propilenoglicol.	38
Figura 7– Coletas de sangue, e organização das amostras para análises laboratoriais. .	42
Figura 8- Perfil de glicose circulante (Média ± EPM) durante o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas por 5 dias em vacas da raça Holandesa em lactação e seca. Efeito de tratamento, categoria, tempo e interações.....	46
Figura 9- Perfil de glicose circulante (Média ± EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG).	47
Figura 10 - Perfil de glicose circulante (Média ± EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG). Efeito principal de tratamento.....	48
Figura 11 - Perfil de insulina circulante (Média ± EPM) durante o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas por 5 dias em vacas da raça Holandesa em lactação e secas.	49
Figura 12- Perfil de insulina circulante (Média ± EPM) durante o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas por 5 dias em vacas da raça Holandesa em lactação e secas. Efeito principal de tratamento.	50

Figura 13- Perfil de insulina circulante (Média ± EPM) durante o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas por 5 dias em vacas da raça Holandesa em lactação e secas. Efeito principal de categoria.	51
Figura 14- Perfil de insulina circulante (Média ± EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG).	52
Figura 15 - Perfil de insulina circulante (Média ± EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG), efeito principal de tratamento.	53
Figura 16- Concentração plasmática de IGF-1 (Média ± EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas suplementadas com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas durante 5 dias.....	54
Figura 17- Concentração plasmática de IGF-1 (Média ± EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG).	55
Figura 18- Concentração plasmática de NEFA (Média ± EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas suplementadas com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas durante 5 dias.	56
Figura 19 - Concentração plasmática de NEFA (Média ± EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas suplementadas com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas durante 5 dias. Efeito principal de tratamento.	57
Figura 20 - Concentração plasmática de NEFA (Média ± EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG).....	58
Figura 21- Concentração plasmática de NEFA (Média ± EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG). Efeito principal de tratamento.	59
Figura 22- Concentração plasmática de BHBA (Média ± EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas suplementadas com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas durante 5 dias.	60
Figura 23- Concentração plasmática de BHBA (Média ± EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas suplementadas com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas durante 5 dias.	61
Figura 24- Concentração plasmática de BHBA (Média ± EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG). Efeito principal de tratamento.	62
Figura 25 - (A) Experimento 1: O tratamento com propilenoglicol aumentou o aporte de glicose e estimulou o aumento da concentração circulante de insulina. Entretanto, não se verificou aumento esperado nas concentrações de IGF-1. Ainda, o tratamento com propilenoglicol reduziu a mobilização de gordura corporal, observada pela redução de	

NEFA e BHBA circulantes. (B) Experimento 2: O tratamento com propilenoglicol proporcionou aumento do aporte energético mas não se verificou efeito no número de oócitos viáveis aspirados. Porém, o tratamento com PPG apresentou efeito positivo na PIVE de vacas em início de lactação e de novilhas 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção in vitro de embriões de novilhas da raça Holandesa lactação (Bos taurus tratadas ou não com propilenoglicol (PPG) durante 5 dias antes da PIVE..... 63

Tabela 2- Produção in vitro de embriões de vacas da raça Holandesa (Bos taurus) secas, tratadas ou não com propilenoglicol (PPG) durante 5 dias antes da PIVE. 64

Tabela 3- Produção in vitro de embriões de vacas da raça Holandesa (Bos taurus) no início da lactação, tratadas ou não com propilenoglicol (PPG) durante 5 dias antes da PIVE. 65

Tabela 4 - Produção in vitro de embriões vacas da raça Holandesa (Bos taurus) final de lactação, tratadas ou não com propilenoglicol (PPG) durante 5 dias antes da PIVE. 66

LISTA DE ABREVIATURAS

PIVE - Produção *in vitro* de embriões;

BEN - Balanço energético negativo;

PPG – Propilenoglicol;

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina 1;

BHBA – Betahidroxibutirato;

NEFA - Ácidos graxos não esterificados;

GH - Hormônio do crescimento;

GLUTs 1-8 – Transportadores de glicose;

AUC – Área abaixo da curva

RNA_m – RNA mensageiro;

OPU - Aspiração folicular guiada por ultrassonografia (*Ovum pick-up*);

ECC - Escore de condição corporal;

LH - Hormônio luteinizante;

RPI - Resistência periférica à insulina;

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	21
2 MODELO HIPOTÉTICO	25
3 HIPÓTESES	27
4 OBJETIVOS	27
4.1 <i>Experimento 1 – Avaliação do perfil metabólico após infusão ruminal de propilenoglicol</i>	27
4.2 <i>Experimento 2 – Produção in vitro de embriões de fêmeas da raça Holandesa após infusão ruminal de propilenoglicol</i>	27
5 REVISÃO DE LITERATURA	28
5.1 <i>Perfil metabólico e endócrino de fêmeas de leite associado à reprodução</i>	28
5.1 <i>Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)</i>	30
5.2 <i>Glicose e insulina</i>	31
5.3 <i>Ácidos Graxos Não Esterificados (NEFA) e Betahidroxibutirato (BHBA)</i>	32
6 MATERIAL E MÉTODOS	34
6.1 <i>Aspectos éticos no uso de animais</i>	34
6.2 <i>Experimento 1 - Avaliação do perfil metabólico após infusão ruminal de propilenoglicol</i>	34
6.2.1 <i>Local, período de execução e origem dos animais</i>	34
6.2.2 <i>Animais e instalações</i>	34
6.2.3 <i>Grupos experimentais, randomização e unidade experimental</i>	34
6.3 <i>Experimento 2 - Produção in vitro de embriões de fêmeas da raça Holandesa após infusão ruminal de propilenoglicol</i>	36
6.3.1 <i>Delineamento experimental</i>	36
6.3.2 <i>Animais e instalações</i>	36
6.3.3 <i>Grupos experimentais, randomização e unidade experimental</i>	36
6.3.1 <i>Aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU)</i>	38
6.3.2 <i>Maturação in vitro</i>	40
6.3.3 <i>Fertilização in vitro</i>	40
6.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
6.4.1 <i>Experimento 1</i>	44
6.4.2 <i>Experimento 2</i>	44
7 RESULTADOS	46
7.1 <i>Experimento 1– Avaliação do perfil metabólico após infusão ruminal de propilenoglicol (PPG) em vacas em início de lactação e em vacas secas (não lactantes)</i>	46
7.2 <i>Experimento 2 – Produção in vitro de embriões de fêmeas da raça Holandesa após infusão ruminal de propilenoglicol</i>	63
8 DISCUSSÃO	67
8.1 <i>Experimento 1</i>	67

8.2	<i>Experimento 2</i>	71
9	CONCLUSÃO	73
10	CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS	74
	BIBLIOGRAFIA	76

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) de doadoras *Bos taurus* com aptidão leiteira apresenta resultados insatisfatórios quando comparado a doadoras *Bos indicus* (PONTES *et al.*, 2010; GIMENES *et al.*, 2015). Vários estudos correlacionam esses resultados a fatores como baixa população folicular, estado metabólico, estresse térmico e/ou nutricional (SALES 2011; BARUSELLI *et al.*, 2012; BATISTA *et al.*, 2014; VIEIRA *et al.*, 2014). Esses estudos também correlacionam a baixa competência oocitária como fator determinante para a baixa eficiência da técnica da PIVE nas fêmeas leiteiras de alta produção. A elevada produção de leite aumenta a demanda energética além da capacidade de ingestão de energia, levando o animal a um estado de balanço energético negativo (BEN) que, por consequência, pode levar a redução da eficiência reprodutiva do rebanho (SANTOS *et al.*, 2008).

Com a finalidade de reduzir os efeitos do estresse metabólico e nutricional de doadoras de embrião da raça Holandesa, é determinante o estabelecimento de estratégias para aumentar a eficiência da PIVE em animais *Bos taurus* (ARMSTRONG *et al.*, 2001; FRERET *et al.*, 2006). Nesse sentido, estudos foram realizados a fim de estabelecer estratégias nutricionais visando o aumento da produção de embriões de doadoras *Bos taurus* (ARMSTRONG *et al.*, 2001; FRERET *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2008; SALES *et al.*, 2015).

Uma estratégia nutricional para aumentar a eficiência reprodutiva de doadoras de embrião ainda pouco estudada quanto aos impactos na reprodução é o tratamento com propilenoglicol (PPG). O PPG é um precursor gliconeogênico amplamente utilizado no tratamento de cetose em vacas no peri-parto e pós-parto recente (NIELSEN; INGVARTSEN, 2004; KRISTENSEN; RAUN, 2007). Vacas com aptidão leiteira submetidas à infusão ruminal de PPG têm incremento da glicose circulante, juntamente com a elevação dos níveis séricos de insulina (NIELSEN; INGVARTSEN, 2004).

Lucy (2008) relatou que a glicose atua coordenando todo o metabolismo animal influenciando positivamente as concentrações de insulina e fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1). A glicose atua estimulando a liberação de insulina que por sua vez influencia o fígado a liberar IGF-1 na circulação. Esses hormônios em conjunto atuam diretamente no ovário estimulando a proliferação, diferenciação e sobrevivência das células foliculares (BUTLER *et al.*, 2003; LUCY, 2008). Vacas de aptidão leiteira e ovelhas em BEN ou subnutridas possuem concentração reduzida de IGF-1 (SCARAMUZZI *et al.*,

2006). Existem estudos que relacionam a baixa concentração circulante de IGF1 com comprometimentos na fertilidade (BUTLER, 2000; ARMSTRONG *et al.*, 2001; SCARAMUZZI *et al.*, 2006

A infusão ruminal de PPG reduz a concentração sérica de betahidroxibutirato (BHBA) e de ácidos graxos não esterificados (NEFA). Esse efeito ocorre devido ao aumento do aporte de glicose, que leva a redução da mobilização das reservas corporais dos animais tratados (STUDER *et al.*, 1993; PICKETT; PIEPENBRINK; OVERTON, 2003). Alguns autores relacionam o efeito negativo dos NEFA sobre a composição e função dos oócitos e células foliculares (LEROY *et al.*, 2011; VAN HOECK *et al.*, 2011; WATHES; CLEMPSON; POLLOTT, 2012).

A capacidade de desenvolvimento oocitário é dependente do aporte energético adequado. A glicose entra nas células através do auxílio de transportadores (GLUTs 1-8; PANTALEON; KAYE, 1998; AUGUSTIN *et al.*, 2001). No entanto, estudos em ratos relatam que o IGF-1 e o hormônio do crescimento (GH) podem afetar a expressão de RNAm GLUT-1 e conseqüentemente, a captação de glicose pelos embriões (ZHOU; BIEVRE; BONDY, 2000). Oropeza (2004) observou que a aplicação intraovariana de IGF-1 em animais pré-púberes promove condições oocitárias favoráveis para estimular posteriormente a transcrição de GLUT-1 durante a ativação do genoma embrionário. Nesse estudo, os embriões que apresentavam maior expressão de RNAm para GLUT-1 foram associados a maior proporção de embriões que progrediram para o estágio de blastocisto. Diante disso, os autores sugeriram que os oócitos de doadoras pré-púberes parecem possuir deficiência na expressão de transportadores de glicose e insuficiente tradução proteica, o que sugere a importância da disponibilidade de glicose para o sucesso na PIVE em bovinos.

Neste contexto, Gamarra *et al.*, (2014) em experimento realizado com novilhas da raça Holandesa, observaram que a infusão oral de PPG foi capaz de alterar o perfil metabólico além de ser efetiva para aumentar a produção *in vitro* de embriões após aspiração folicular guiada por ultrassonografia (*Ovum pick-up* – OPU). Alterações metabólicas no plasma tem alta correlação com alterações no líquido folicular (LEROY *et al.*, 2004), portanto essas alterações podem refletir na qualidade do oócito do folículo recrutado em condições metabólicas mais favoráveis, e, por consequência, melhores resultado na PIVE.

De acordo Bauman e Bruce Currie (1980), nas três semanas iniciais da lactação ocorrem mudanças metabólicas e hormonais, a fim de priorizar a demanda energética requisitada pela glândula mamária. No início da lactação a maior demanda energética para

suportar a produção de leite não está sincronizada com o aumento de consumo de matéria seca, resultando em BEN (OLIVEIRA, 2016). Nessa fase, verifica-se a mobilização das reservas corporais que promove a perda de escore de condição corporal (ECC), bem como, o declínio das concentrações basais de insulina (CHILLIARD *et al.*, 2000; BOSSAERT *et al.*, 2008). Vacas em lactação usualmente apresentam BEN, evento que afeta diretamente a fertilidade no período pós-parto (BELL, 1995; BUTLER, 2003) e em resposta ao BEM há comprometimento no reinício da atividade ovariana após o parto (LEROY *et al.*, 2008). Também se verifica uma redução na frequência de pulsos de hormônio luteinizante (LH) e diminuição das concentrações séricas de glicose e insulina (BUTLER, 2000).

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

A resistência periférica à insulina (RPI) ocorre quando há redução na sensibilidade dos tecidos para responder às concentrações fisiológicas de insulina (BOURA-HALFON; ZICK, 2009a). O mecanismo de RPI pode se estabelecer pela diminuição tanto na capacidade de resposta à insulina quanto na sensibilidade à insulina (DE AZEVEDO; COELHO, 2016). Desta forma, em vacas, a RPI pode interferir no transporte de glicose no embrião e aumentar a apoptose (SANTOS *et al.*, 2008) ou reduzir a qualidade do oócito (GONG *et al.*, 2002), depressão da qualidade oocitária e do desenvolvimento embrionário (BARUSELLI *et al.*, 2011b, 2016; FERREIRA *et al.*, 2011; SALES, 2011; SALES *et al.*, 2015; BARUSELLI *et al.*, 2016).

Já a categoria de novilhas possui demanda nutricional para o crescimento. Entretanto, nessa categoria verifica-se baixa eficiência na PIVE devido a redução da competência oocitária (BARUSELLI *et al.*, 2016). Diante disso, Oropeza *et al.* (2004), sugeriram que os oócitos de doadoras pré-púberes parecem possuir comprometimento na expressão de transportadores de glicose e insuficiente tradução proteica, o que sugere a importância da disponibilidade de glicose para o sucesso na PIVE em bovinos.

Baseado nesses conhecimentos, o presente estudo propôs estudar o efeito do tratamento com PPG por cinco dias antes da OPU no metabolismo energético e na PIVE de

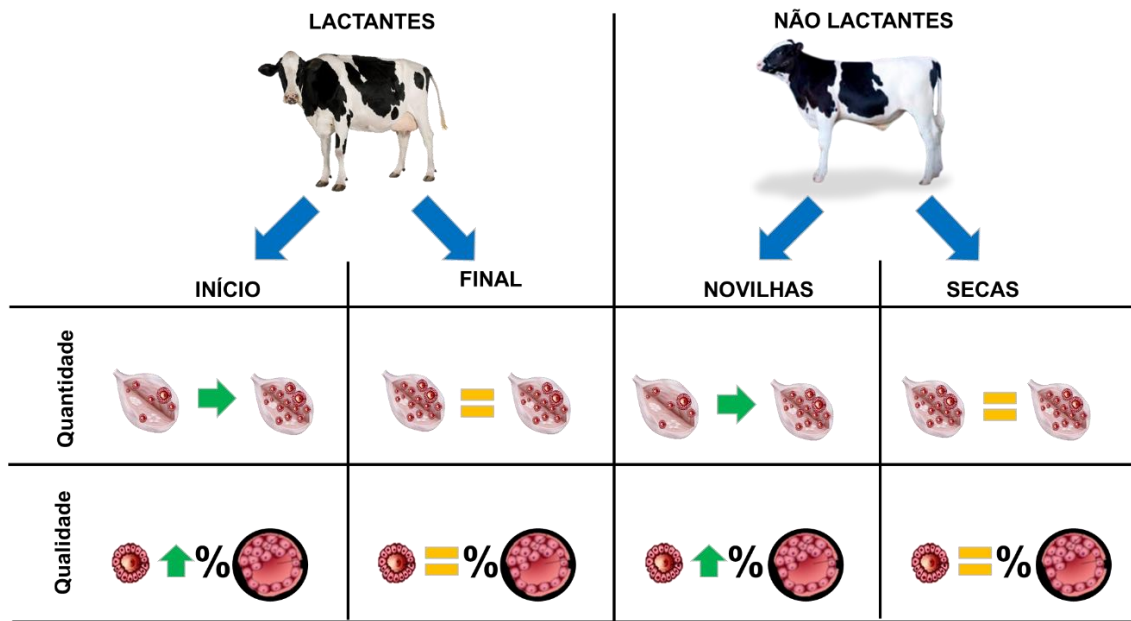
vacas em diferentes fases da lactação, vacas secas e novilhas da raça Holandesa. A hipótese é de que todas as categorias tratadas com propilenoglicol apresentem aumento do aporte energético, resultando na melhora da qualidade oocitária e da PIVE. Entretanto, espera-se que o aumento seja mais evidente em vacas no pico de lactação e em novilhas (*Figura 1 – A e B*).

2 MODELO HIPOTÉTICO

Figura 1(A) Experimento 1: No início da lactação há maior demanda energética para atender a produção de leite, concomitantemente com a redução no consumo de matéria seca, resultando em BEN. Com isso, verifica-se a mobilização das reservas corporais que promove a perda de ECC. O tratamento com propilenoglicol aumenta o aporte de glicose, que estimula a liberação de insulina e IGF-1. Esses efeitos promovem a redução da mobilização de gordura corporal e, conseqüentemente, redução dos NEFA e BHBA circulantes. (B) Experimento 2: O tratamento com propilenoglicol proporciona aumento do aporte energético e tem efeito positivo na competência oocitária, no número folículos e de oócitos viáveis aspirados e, conseqüentemente, maior eficiência na PIVE. Para confirmar as hipóteses levantadas será avaliado o efeito do tratamento com propilenoglicol em diferentes categorias de animais lactantes (vacas em início e final de lactação) e não lactantes (novilhas e vacas secas).

	LACTANTES		NÃO LACTANTES VACAS SECAS	
	CONTROLE	PPG	CONTROLE	PPG
GLICOSE	==	+	==	+
INSULINA	==	+	==	==
IGF-1	==	+	==	==
BHBA	==	-	==	==
NEFA	==	-	==	==

(A) Experimento 1



(B) Experimento 2

3 HIPÓTESES

3.1 Experimento 1 – Avaliação do perfil metabólico após infusão ruminal de propilenoglicol

A infusão ruminal de 500 mL de propilenoglicol altera o metabolismo, aumentando as concentrações circulantes de glicose, insulina e IGF-1 dos animais tratados e reduz NEFA e BHBA em vacas no início em lactação e novilhas.

3.2 Experimento 2 – Produção in vitro de embriões de fêmeas da raça Holandesa após infusão ruminal de propilenoglicol

A infusão ruminal de 500 mL de propilenoglicol em fêmeas da raça Holandesa melhora a qualidade oocitária e conseqüentemente a PIVE, em vacas no início de lactação e novilhas.

4 OBJETIVOS

4.1 Experimento 1 – Avaliação do perfil metabólico após infusão ruminal de propilenoglicol

Avaliar o efeito da infusão ruminal de 500 mL de propilenoglicol duas vezes ao dia por 5 dias sobre as concentrações séricas de glicose, insulina, BHBA, NEFA e IGF-1.

4.2 Experimento 2 – Produção in vitro de embriões de fêmeas da raça Holandesa após infusão ruminal de propilenoglicol

Avaliar os efeitos da infusão ruminal de 500 mL de propilenoglicol duas vezes ao dia por 5 dias na qualidade dos oócitos e subsequente aumento da produção *in vitro* de embriões de vacas em início de lactação, vacas no final de lactação, vacas secas e novilhas da raça Holandesa.

5 REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Perfil metabólico e endócrino de fêmeas de leite associado à reprodução

A vaca de aptidão leiteira é incapaz de consumir nutrientes suficientes para atender sua demanda energética de produção e manutenção no início da lactação. Muitas mudanças metabólicas ocorrem para suportar as demandas elevadas durante a lactação, e este complexo processo envolve não apenas a glândula mamária, mas muitos outros tecidos (COLLIER *et al.*, 1984). As principais alterações metabólicas que ocorrem para suprir a glândula mamária com a energia, glicose, aminoácidos e cálcio necessários incluem o aumento do fluxo sanguíneo para a glândula mamária e o aumento da atividade metabólica da glândula mamária com a diminuição da utilização de tecido adiposo periférico (COLLIER *et al.*, 1984).

No início da lactação a vaca se encontra em Balanço Energético Negativo (BEN), período esse que a ingestão de matéria seca é menor que a demanda energética para a produção de leite. Durante o BEN, nutrientes oxidáveis da dieta são priorizados para atender a processos essenciais como manutenção de células, circulação sanguínea, e atividade neural (WADE & JONES., 2004). Os controles homeorréticos no início da lactação asseguram uma mudança no metabolismo lipídico resultando em aumento da lipólise e diminuição da lipogênese (INVARTSEN & ANDERSEN, 2000). A utilização de glicose pelos tecidos é reduzida, enquanto há aumento no uso de lipídios para produção de energia via gliconeogênese hepática, para priorizar a produção de leite. Essas alterações metabólicas podem levar o animal a um quadro de cetose metabólica (SANTOS, *et al.*, 2008).

Altas concentrações de ácidos graxos no fluido folicular durante o BEN podem prejudicar a fecundação e o desenvolvimento embrionário precoce (LEROY *et al.*, 2005). Kendrick *et al.*, (1999) relataram melhora na qualidade oocitária durante o período pós-parto, após melhora no balanço energético e reestabelecimento das concentrações de estradiol no fluido folicular, particularmente em vacas leiteiras em lactação recebendo uma dieta com concentração de energia adequada. Neste contexto, estudos relataram que mudanças endocrinológicas, associadas ao balanço energético durante a lactação, tem relação direta com a concentração de metabólitos no fluido folicular, que interferem de forma negativa na qualidade oocitária (BUTLER *et al.*, 2003; LEROY *et al.*, 2005; WILTBANK *et al.*, 2006).

Por outro lado, o consumo excessivo de energia tanto em vacas não lactantes como em vacas no fim da lactação, pode comprometer o desenvolvimento de oócitos *in vitro* e a qualidade do embrião *in vivo* (SINCLAIR *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2008;; DE KOSTER *et al.*, 2013; LEIVA *et al.*, 2015; SALES *et al.*, 2015; BARUSELLI *et al.*, 2016). O impacto do aumento da ingestão de energia na qualidade do oócito e do embrião pode depender do estado metabólico da doadora, uma vez que os efeitos deletérios ocorrerem em animais com alto escore de condição corporal (ECC) (ADAMIAK *et al.*, 2005; ADAMIAK *et al.*, 2006). Os tecidos de vacas com alto ECC são menos responsivos à insulina e desenvolvem resistência à insulina, exigindo, portanto, maiores concentrações de insulina para alcançar respostas metabólicas celulares normais (HOLTENIUS & HOLTENIUS, 2007; MINGOTTI, 2018).

Em humanos, períodos prolongados de concentrações de NEFA aumentadas, como na obesidade, aumentam o risco de diabetes *mellitus* tipo II. Este mecanismo ocorre devido à descompensação e exaustão das ilhotas de Langerhans após episódios prolongados de resistência à insulina e hiperinsulinemia (GOLAY & YBARRA, 2005). Além disso, um efeito deletério direto dos ácidos graxos na secreção e viabilidade da insulina das células β pancreáticas foram relatados por estudos *in vitro* em humanos (ZHOU & GRILL, 1995) e ratos (MAEDLER *et al.*, 2001).

Bossaert *et al.*, (2008) observaram que após o tratamento com glicose o pico e área abaixo da curva (AUC) de insulina diminuiu e o *clearance* da glicose aumentou em vacas durante a lactação quando comparado com vacas no período seco. Esses achados, juntamente com o fato de que a taxa de depuração da insulina não aumentou durante a lactação, sugerem que a baixa AUC é provavelmente causada pela baixa secreção de insulina. Esse quadro pode representar um desafio metabólico adicional para que a vaca enfrente o delicado período de adaptação à lactação. Esses mesmos autores verificaram que a AUC e o pico de insulina foram negativamente relacionadas com as concentrações concomitantes de NEFA. Esses achados evidenciam os potenciais efeitos negativos de concentrações plasmáticas de NEFA elevadas, em células do pâncreas de bovinos, como relatado em outras espécies (BOSSAERT *et al.*, 2008).

A baixa concentração de insulina resulta em lipólise e concentrações circulantes elevadas de NEFA, que por sua vez, têm um efeito prejudicial na função das células da granulosa (VANHOLDER *et al.*, 2005). Vários estudos demonstraram que baixas concentrações de insulina desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de

distúrbios reprodutivos e metabólicos (SPICER & ECH-TERNKAMP, 1995; GUTIERREZ *et al.*, 1997; MIYOSHI *et al.*, 2001; GONG *et al.*, 2002; VANHOLDER *et al.*, 2005). Por outro lado, estudos evidenciaram que os baixos níveis de insulina estão associados genotipicamente (GUTIERREZ *et al.*, 2006) e fenotipicamente (INGVARTSEN & FRIGGENS, 2005) com alta produção de leite.

5.1 Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)

O IGF-1 é um polipeptídeo de 70 aminoácidos descrito inicialmente como “somatomedina C”, e foi a primeira proteína descrita em mamíferos como mediadora da ação do GH, e há relatos de sintetização de IGF-1 pelo sistema nervoso central, músculos e vários outros tecidos, entretanto, a maior parte deste peptídeo, encontrado no plasma, é de origem hepática (LEWIS *et al.*, 1993).

Nos tecidos fetais, glândula mamária e fígado, o principal transportador de glicose para as células é o GLUT-1, que é independente de insulina (ZHAO; KEATING, 2007). A relação do IGF-1 com a glicose se dá pelo efeito direto deste fator de crescimento sobre os transportadores de glicose GLUT-1 e GLUT-4 (MUECKLER *et al.*, 1990; WILSON *et al.*, 1995). Zhou *et al.* (2000) relataram que o aumento da expressão de transportadores GLUT-1 no folículo, causado pelo IGF-1, indicam sua atuação direta, através de uma variedade de mecanismos moleculares, como o aumento do aporte de glicose, na promoção do crescimento e desenvolvimento folicular.

O GH produzido pela célula somatotrófica a hipófise anterior, se liga aos receptores do tecido alvo visando estimular o crescimento (HERRINGTO; COSTER-SU, 2001) e têm relação direta com o IGF-1, induzindo a diferenciação das células precursoras deste polipeptídeo, que estimula a divisão celular. Além de estimular a síntese proteica, gliconeogênese e também participa da ovulação (BARNETT, *et al.*, 2006).

Outro mecanismo de ação já descrito a respeito do IGF-1 é a sua capacidade de tornar o ovário responsivo às gonadotrofinas, amplificando os efeitos do hormônio folículo estimulante (FSH) e do LH no crescimento e diferenciação dos folículos ovarianos, influenciando diretamente no desenvolvimento e maturação do oócito (SPICER *et al.*, 1993; LUCY, 2000).

Estudos relataram que a principal fonte de IGF-1 encontrado no líquido folicular, em ruminantes, é derivado da circulação sanguínea (LEEUWENBERG *et al.*, 1996; PERKS *et al.*, 1999; SCHAMS *et al.*, 2002). Produzido também pelas células da granulosa adjacentes, esta molécula visa atender a demanda anabólica que se encontra aumentada durante a fase de crescimento do oócito, promovendo a expressão e tradução dos transportadores de glicose do oócito (WASSARMAN *et al.*, 1988).

Fatores que afetam o estado fisiológico da vaca como subnutrição, doenças ou início de lactação, tornam o fígado resistente ao GH e nesses casos os receptores sofrem *down regulation* à ação normal do GH na síntese do IGF-1, tornando-se desacoplados, não aumentando a concentração de IGF-1 apesar do aumento das concentrações de GH (THISSEN *et al.*, 1994; LANG; FROST, 2002).

Stchoppee *et al.* (1996), em estudos realizados com bovinos, encontraram a primeira evidência de que a restrição crônica de nutrientes diminui a concentração de IGF-1 no fluido folicular, principalmente antes da fase de seleção folicular, antes da dominância, devido a incapacidade de o FSH suportar a função folicular normal na ausência de IGF-1 sistêmico.

5.2 Glicose e insulina

A insulina é um hormônio peptídico com ação na homeostase glicêmica por meio do estímulo à captação de glicose nos tecidos sensíveis, responsável pelo controle da gliconeogênese hepática, regulação da foliculogênese, maturação oocitária e desenvolvimento embrionário (KAHN; FLIER, 2000; CHAVES *et al.*, 2011). O metabolismo da glicose em ruminantes se apresenta como um grande desafio para o animal, uma vez que a fermentação dos carboidratos pela microbiota ruminal resulta em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e desta forma a glicose tem necessidade de ser sintetizada novamente no fígado para que seja usada pelo animal.

Em vacas que se apresentam em BEN, a glicose tem capacidade de causar alterações endócrinas na liberação de insulina pelo pâncreas e de IGF-1 pelo fígado, influenciando diretamente na distribuição dos nutrientes para os tecidos periféricos (BUTLER *et al.*, 2003; LUCY, 2008). Conseqüentemente, a perda do ECC causada pela mobilização das reservas energéticas, promove declínio nas concentrações basais de insulina, bem como na sua secreção, induzida pela glicose (BOSSAERT *et al.*, 2008).

Devido a isso, enquanto o animal apresentar baixos níveis séricos de glicose consequentemente os níveis séricos de insulina e IGF-1 se encontrarão reduzidos, principalmente durante a lactação na fase de BEN, o que leva o animal a permanecer em estado catabólico (LUCY, 2012). A mudança do estado catabólico para o estado anabólico é um importante regulador do eixo reprodutivo (KAWASHIMA *et al.*, 2012) e dentro desse contexto, Lucy (2012) relaciona os níveis séricos de glicose, no pós-parto, ao estabelecimento da gestação vários meses após as medições de glicose serem feitas, podendo ser esse parâmetro, um preditor de fertilidade.

LeRoy e colaboradores (2008) afirmam que a glicose e a insulina são as moléculas mais prováveis para exercer um efeito sobre a secreção hipotalâmica de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) em vacas de aptidão leiteira no pós-parto, a nível do ovário. A glicose circulante e os sistemas insulina / IGF-1, portanto, estão funcionalmente ligados em todo o animal (LUCY, 2011; KAWASHIMA *et al.*, 2012).

O oócito possui alta demanda metabólica durante o seu desenvolvimento e maturação, sendo seu principal substrato energético a glicose, necessitando de um maior aporte de glicose para se desenvolver (ZHOU *et al.*, 1991; OLIVIER *et al.*, 1994). O perfil metabólico regulado pela glicose no pós-parto tem a capacidade afetar diretamente o tecido ovariano através de efeitos permanentes no genoma oocitário ou ainda alterando a composição química das próprias células (LUCY, 2011). Estudos anteriores avaliaram a influência negativa da baixa concentração de glicose sérica e sua relação com o NEFA sobre a composição do oócito e função das células foliculares (LEROY *et al.*, 2011).

5.3 Ácidos Graxos Não Esterificados (NEFA) e Betahidroxibutirato (BHBA)

Embora o manejo nutricional tenha melhorado para vacas de alta produção de leite, esses animais passam por um período de BEN severo durante o início da lactação (BELL *et al.*, 1995). Como o consumo de energia necessário para a produção de leite excede a produção, as vacas leiteiras no pós-parto têm que retomar os ciclos ovarianos normais em meio ao BEN para otimizar a fertilidade.

Uma característica metabólica do BEN é a mobilização de gordura corporal refletida no aumento da concentração de NEFA circulante (VAN DEN TOP *et al.*, 1995; DE VRIES

et al., 1999). Estudos confirmam a evidência da captação de NEFA pelo ovário, bem como uma forte correlação entre a concentração de NEFA no plasma e no fluido folicular, que explica possíveis efeitos nocivos dos NEFA nas células da granulosa e oócito (COMIN *et al.*, 2002; JORRITSMA *et al.*, 2003).

O tecido adiposo mobilizado fornece energia na forma de NEFA, elevando as concentrações plasmáticas aproximadamente 10 dias antes do parto (KAPPEL *et al.*, 1984; WESTWOOD *et al.*, 2002). Desta forma, as concentrações plasmáticas de NEFA são máximas no momento do parto, devido ao estresse, e diminuem rapidamente no pós-parto, permanecendo ainda mais altas do que antes do parto (KAPPEL *et al.*, 1984).

O fígado é responsável por metabolizar o NEFA circulante, que pode ser completamente oxidado para produção de adenosina trifosfato (ATP), exportado como lipoproteínas, ou parcialmente oxidado em seis corpos de BHBA e outros corpos cetônicos (REYNOLDS *et al.*, 2003; VON SOOSTEN *et al.*, 2011; BICALHO *et al.*, 2017).

Leroy *et al.* (2005) em experimento realizado com maturação *in vitro* de oócitos, relataram que concentrações elevadas NEFA no fluido folicular por 24 horas têm efeito negativo na qualidade do oócito e no desenvolvimento embrionário. Van Hoek e colaboradores (2011) encontraram redução na taxa de blastocistos oriundos de oócitos que foram expostos a altas concentrações NEFA durante o seu desenvolvimento, impactando no desenvolvimento após a ativação do genoma oocitário. Dados de estudos realizados com camundongos obesos sustentam o fato de que concentrações elevadas de NEFA contribuem para a redução da fertilidade observada em fêmeas com status metabólico comprometido (MINGE *et al.*, 2008; IGOSHEVA *et al.*, 2010).

Outros estudos revelaram redução na taxa de blastocistos oriundos de oócitos expostos a altas concentrações de NEFA, indicando que essa exposição durante o desenvolvimento oocitário causa impacto negativo no desenvolvimento e padrão de transcrição gênica, pós ativação do genoma embrionário (VAN HOECK, *et al.*, 2011). Minge *et al.* (2008) encontraram resultados que sustentam ainda mais o efeito do NEFA na redução da fertilidade em fêmeas com status metabólico comprometido.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Aspectos éticos no uso de animais

O presente estudo está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

6.2 Experimento 1 - Avaliação do perfil metabólico após infusão ruminal de propilenoglicol

6.2.1 Local, período de execução e origem dos animais

Esse experimento foi realizado entre os meses de Julho a Agosto de 2018, na fazenda Palmeiras do Instituto de Zootecnia (IZ-APTA), localizada no município de Nova Odessa - SP -Brasil.

6.2.2 Animais e instalações

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

6.2.3 Grupos experimentais, randomização e unidade experimental

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

1 – Vacas no terço inicial da lactação (IL; n=14; Figura 2):

- Multíparas;
- DEL \geq 90 dias (terço inicial da lactação);
- ECC $>$ 2,5.

Figura 2- Vacas no terço inicial da lactação com produção média de 30,5 L de leite.



2 – Vacas secas (VS; n=14; Figura 3):

- Multíparas;
- DEL \geq 300 dias (terço final da lactação);
- ECC $>$ 3,5.

Figura 3 - Vacas multíparas secas, observa-se o alto ECC.

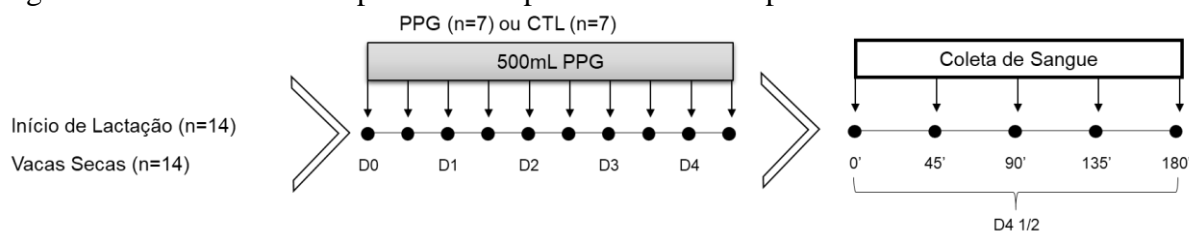


6.3 Experimento 2 - Produção *in vitro* de embriões de fêmeas da raça Holandesa após infusão ruminal de propilenoglicol

6.3.1 Delineamento experimental

O presente experimento foi inteiramente casualizado (DIC), no qual os animais distribuídos aleatoriamente entre os dois grupos experimentais. Foram realizadas coletas de sangue 90 minutos após o tratamento com PPG para análises de insulina, glicose, IGF-1, NEFA e BHBA. No dia 5 foram realizadas 5 coletas seriadas a cada 45 minutos após o tratamento (0, 45, 90, 135 e 180 minutos) para análises de insulina, glicose, NEFA e BHA seguindo o esquema proposto na *Figura* abaixo (*Figura 4*).

Figura 4 – Delineamento experimental e perfil metabólico após infusão ruminal de PPG.



Experimento 2

6.3.2 Animais e instalações

Vinte e oito fêmeas bovinas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) foram utilizadas nesse experimento. Os animais permaneceram em sistema de estabulação livre do tipo “*free stall*” com acesso a comida e água *ad libitum* (manejo estabelecido na propriedade). A alimentação era composta por silagem de milho e concentrado a base de soja e milho, suficientes para suprir ou sobrepor os requerimentos nutricionais de cada categoria (NRC 2001).

6.3.3 Grupos experimentais, randomização e unidade experimental

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

- 1 – Vacas no terço inicial da lactação (IL; n=80):
 - Multíparas;
 - DEL \geq 90 dias (terço inicial da lactação);
 - ECC $>$ 2,5.

- 2 – Vacas no final da lactação (FL; n=80):
 - Multíparas;
 - DEL \geq 300 dias (terço final da lactação);
 - IA \geq 3;
 - ECC \geq 3,5.

- 3 – Vacas secas (VS; n=80):
 - Multíparas;
 - DEL \geq 300 dias (terço final da lactação);
 - ECC \geq 3,5.

- 4 – Novilhas (NOV; n=80):
 - Púberes;
 - Idade \pm 14 meses;
 - ECC \geq 3,75.

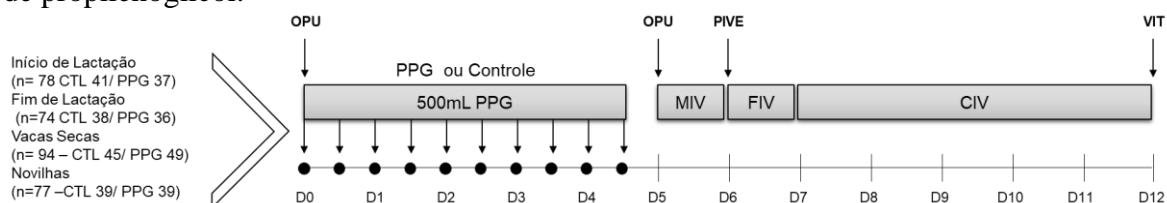
Um total de 323 fêmeas bovinas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) divididas em quatro diferentes categorias foram utilizadas, sendo: vacas em início de lactação (n=78; DEL entre 30 e 70 dias), vacas fim de lactação (n=80), novilhas (n=77), e. vacas secas (n=93). Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (GC): animais que não receberam propilenoglicol (n=40) e grupo propilenoglicol (PPG) (*Figura 5*): Animais receberam infusão ruminal de 500 mL de propilenoglicol duas vezes ao dia após a primeira e segunda ordenha (06:00h e 16:00h) durante cinco dias (n=40).

Figura 5 – Vacas recebendo infusão ruminal de 500 mL de propilenoglicol, utilizando sonda de borracha , a fim de evitar menor incômodo aos animais.



A primeira OPU foi realizada no dia 0 para ablação folicular e sincronização da emergência de onda de crescimento folicular. A segunda OPU para PIVE foi realizada 5 dia após a ablação folicular (*Figura 6*).

Figura 6 – Produção in vitro de embriões de fêmeas da raça Holandesa após infusão ruminal de propilenoglicol.



6.3.1 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU)

As OPUs foram realizadas na própria fazenda pelo Médico Veterinário Bernardo Marcozzi Bayeux, da empresa Bovigênese - Reprodução Animal. Os materiais da OPU, bem como os procedimentos para a realização da PIVE foram cedidos e realizados pela empresa WTA-FIV, sob coordenação da Médica Veterinária Yeda Fumie Watanabe.

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

Todos os folículos visíveis (≥ 3 mm) foram aspirados com um sistema de agulha descartável (20 G; 0.9 x 50 mm; Terumo, Europe NV, Belgium), acoplado à linha de aspiração de Teflon de 1,7 mm de diâmetro e 110 cm de comprimento (WTA, Cravinhos-SP, Brasil). Todo o sistema de aspiração foi submetido à pressão negativa entre 12 a 15 mL de água/minuto (85 a 90 mmHg) produzida por uma bomba de vácuo com aquecedor de tubo de 50 mL (WTA, Cravinhos-SP, Brasil).

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

Os CCOs foram morfológicamente classificados como viáveis ou inviáveis de acordo com as características citoplasmáticas do oócito e o número de camadas de células do *cumulus* em CCOs compactos com mais de três camadas de células do *cumulus* e oócitos com citoplasma homogêneo (Grau I), CCOs compactos com três camadas ou menos de células do *cumulus* e oócitos com citoplasma levemente heterogêneo (Grau II) e CCOs parcialmente desnudos e oócitos com citoplasma heterogêneo (Grau III) foram considerados viáveis para a PIVE e utilizados nesse estudo. Oócitos desnudos ou degenerados, oócitos desprovidos de células do *cumulus* na maior parte da superfície da zona pelúcida ou com citoplasma retraído e vacuolizado, e CCOs com células do *cumulus* expandidas foram considerados inviáveis para a PIVE (WRIGHT, 1998) e descartados desse estudo.

Após a classificação, os CCOs foram lavados em solução de TCM 199 (Gibco) suplementado com 10% SFB (Gibco) e uma vez em meio de maturação (TCM 199 suplementado com 10% de SFB, 5 μ g/mL de FSH, 50 μ g/mL de LH e 01 μ g/mL de estradiol). Em seguida foram transportados para um microtubo (WTA, Cravinhos-SP, Brasil) com meio de maturação (MIV) sob óleo mineral (500 μ L de meio MIV + 400 μ L de óleo mineral). Os microtubos foram levados em transportadora de oócitos - Labmix (WTA®) com temperatura

de 38,5°C e atmosfera gasosa controlada (6% de CO₂ + 5% de O₂ + 89% de N₂), sendo realizada a maturação durante o transporte com uma pressão hidrostática controlada de 15 mmHg (Labmix).

6.3.2 Maturação *in vitro*

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

6.3.3 Fertilização *in vitro*

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

A concentração foi ajustada para 1x10⁶ spz/mL. O meio utilizado na fecundação *in vitro* foi o meio Tyrode modificado (TALP) acrescido de soluções de Penicilamida, Hipotaurina e Epinefrina (PHE) e 10µg/mL de heparina. Os gametas permaneceram incubados em placas com micro gotas de 70µL cobertas com óleo mineral, por 20-22 horas a 38,5°C com baixa tensão de oxigênio.

6.3.4 Cultivo *in vitro*

Após o tempo de incubação dos gametas, os prováveis zigotos foram lavados para retirar o excesso de células do *cumulus* e transferidos para uma placa contendo micro gotas de 70 µL de meio de cultivo (CR2 modificado acrescido de SFB e BSA), cobertos por óleo mineral de acordo com os protocolos de Watanabe (1998). Esses permaneceram na

incubadora de bancada (EVE – WTA®) por um período de 7 a 9 dias mantidos a temperatura de 38,5°C com baixa tensão de oxigênio (6:5:89) e pressão hidrostática de 5 mmHg.

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

6.4 Coletas de sangue, análise metabólica e hormonal

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

Figura 7– Coletas de sangue, e organização das amostras para análises laboratoriais.



6.5 *Análise metabólica e hormonal*

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

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

6.5.1 *Análise de insulina*

A metodologia para a mensuração quantitativa de insulina bovina (b-Insulina), assim como, a avaliação da precisão do ensaio com os valores de Intra-ensaio e Inter-ensaio estão apresentados nos **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

6.5.2 *Análise de IGF-1*

As análises de para mensuração de IGF-1 plasmática foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia Animal Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, Campus Araçatuba.

O IGF-1 total foi quantificado por ELISA utilizando o sistema de amplificação biotina-estreptavidina peroxidase em um ensaio competitivo, como descrito por Maioli (2016). Foram adicionados 60 uL dos padrões, amostras (sendo que nos poços referentes a ligação não específica, ligação máxima e branco foi adicionado tampão de ensaio), 100 µL/poço do anticorpo anti-IGF-1 (Hormone & Pituitary Program, Harbor-UCLA Medical Centre, Carson, CA, USA, #AFP4892898) na diluição 1:250.000 seguido pela adição de 100 µL/poço do IGF-1 biotilado (0,06 ng/poço). Após uma incubação de 24 horas a 4°C foram realizadas duas lavagens com Tween 80 0,05%.

Após as lavagens foram adicionados 2,5 mU de peroxidase/100 µL/poço (Streptavidin-POD conjugate 500 U/mL, Roche). As microplacas foram então protegidas da luz e incubadas por 30 minutos à 4°C. Ao término da incubação as placas foram submetidas a 2 lavagens com Tween 80 0,05%, e então foram adicionados 100 µL/poço de substrato composto por 2 mM 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), 100 mM de ácido cítrico, 10,63 mM de peróxido de ureia, 126,8 mM de Na₂HPO₄ e 4% de DMSO.

As microplacas foram então incubadas a 37°C, protegidas da luz, por 40 minutos e a reação de oxidação do substrato pela enzima foi interrompida pela adição de 30 µL/poço de ácido sulfúrico 2M. A determinação da densidade óptica foi imediatamente realizada, em

leitadora de microplacas (Sunrise, Tecan, cod. 16039400), utilizando o comprimento de onda de 450 nm.

Para o cálculo das doses, as concentrações dos padrões foram convertidas em log de base 10 (eixo x), e as densidades ópticas, após os cálculos de conversão em porcentagem da ligação máxima (% B/B0) foram convertidos com a função logit. As conversões foram realizadas pela interpolação após o cálculo de regressão linear.

6.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

6.6.1 Experimento 1

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

Para medidas repetidas no tempo, o modelo incluiu efeito de grupo (controle, PPG, secas e lactantes), momento (tempo 0 a 13) e interações especificando a distribuição Poisson. Tempo e resíduos foram inseridos como efeito aleatório, animal (categoria) foi usado como erro termo, ECC foi utilizado como covariável ao modelo. Além disso, especificou a opção, $ddfm = kenwardroger$ para correção dos graus de liberdade das variâncias. A estrutura de covariância selecionada foi não estruturada de primeira ordem [UN(1)], a qual forneceu o melhor ajuste para estas análises de acordo com o critério de informação de Akaike. O teste post hoc de diferença significativa incluiu ajuste de Tukey para determinar diferenças entre grupo, momento e interação grupo*tempo. Os valores foram apresentados como média \pm SEM. Diferenças foram aceitas para valores de $P \leq 0,1$.

6.6.2 Experimento 2

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

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

Para análises da PIVE, o número total de oócitos recuperados foi utilizado como covariável ao modelo. O teste *post hoc* de diferença significativa incluiu ajuste de Tukey. Os valores foram apresentados como média \pm SEM. Diferenças foram aceitas para valores de $P \leq 0,1$.

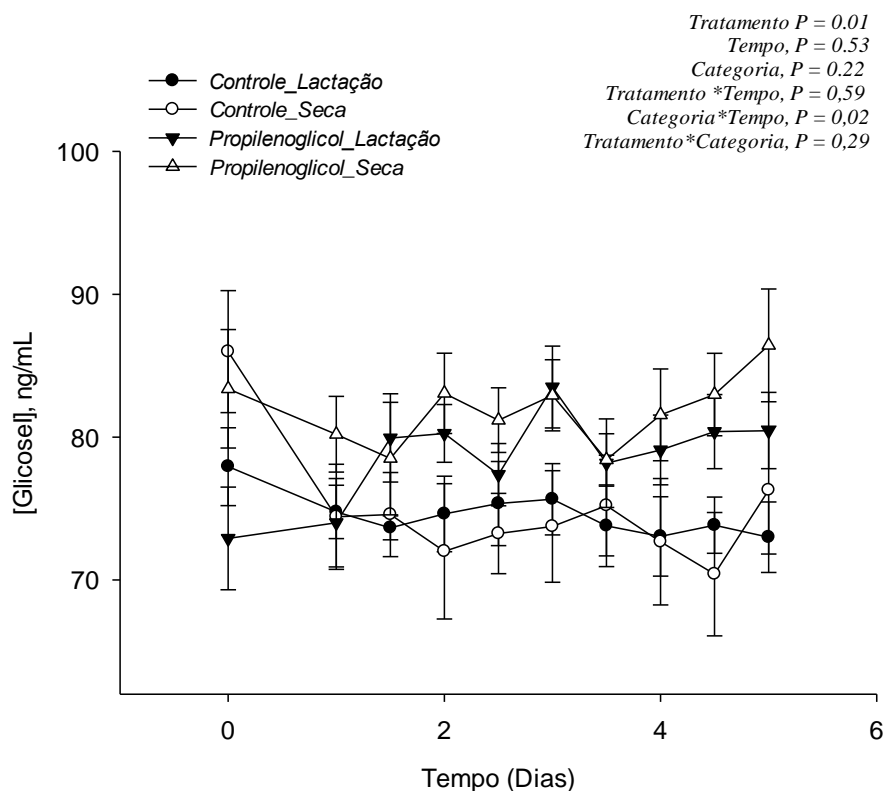
7 RESULTADOS

7.1 Experimento 1– Avaliação do perfil metabólico após infusão ruminal de propilenoglicol (PPG) em vacas em início de lactação e em vacas secas (não lactantes)

A seguir são apresentados os gráficos com o perfil metabólico dos animais tratados ou não com propilenoglicol (efeito de categoria, tratamento, tempo e interações).

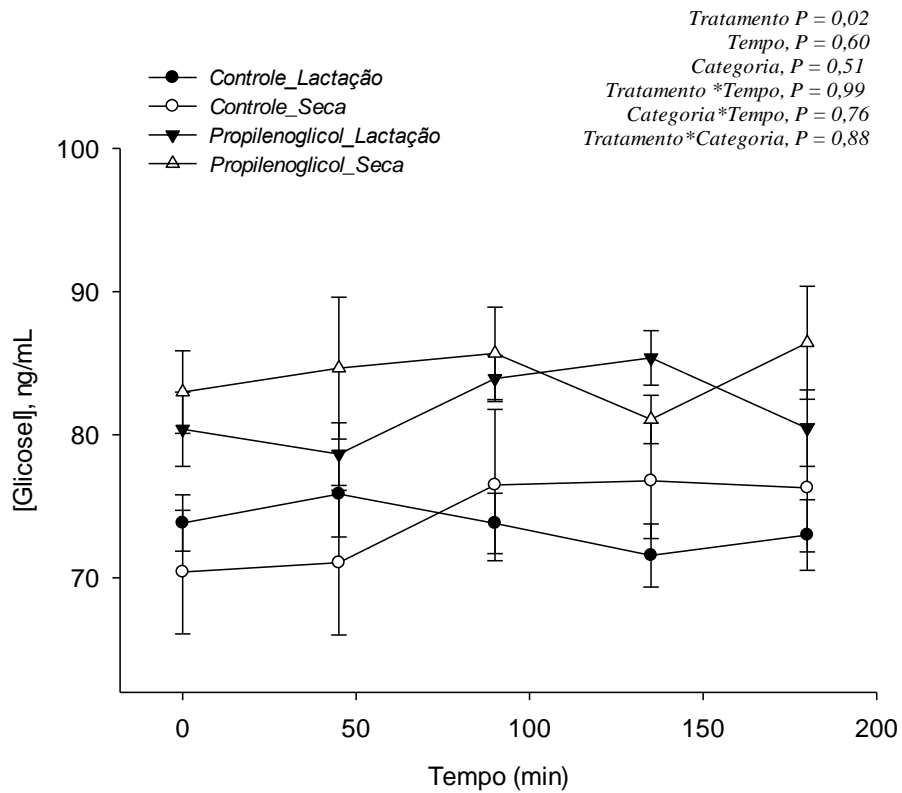
Verificou-se efeito do tratamento com PPG (tratamento; $P=0,01$), com aumento da glicose circulante nos animais tratados. Observou-se também efeito Categoria*Tempo ($P=0,02$) para o perfil de glicose circulante nas vacas no início de lactação e vacas secas. Não se verificou efeito de tempo ($P=0,53$) e de categoria ($P=0,22$) para essa variável. Os dados estão apresentados na Figura 8.

Figura 8- Perfil de glicose circulante (Média \pm EPM) durante o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas por 5 dias em vacas da raça Holandesa em lactação e seca. Efeito de tratamento, categoria, tempo e interações.



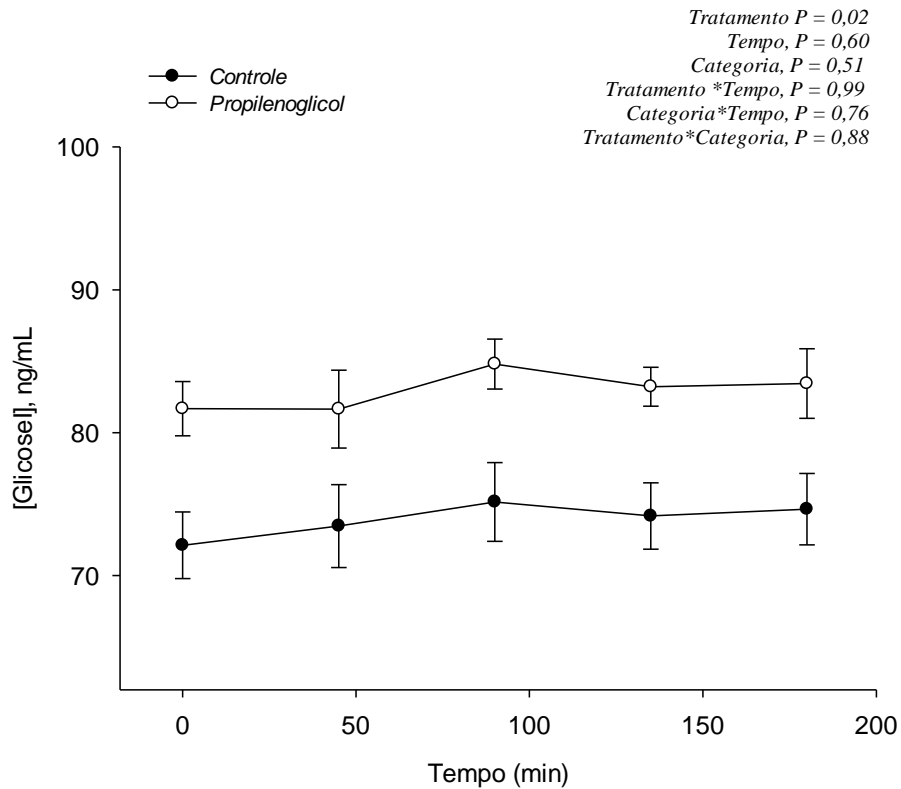
Ainda, o perfil de glicose circulante, houve aumento da concentração de glicose sérica durante 180 minutos após o tratamento com PPG. Não houve interação Tratamento*Tempo ($P=0,99$), Categoria*Tempo ($P=0,76$) e Tratamento*Categoria ($P=0,88$). Os dados estão apresentados na Figura 9.

Figura 9- Perfil de glicose circulante (Média \pm EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG).



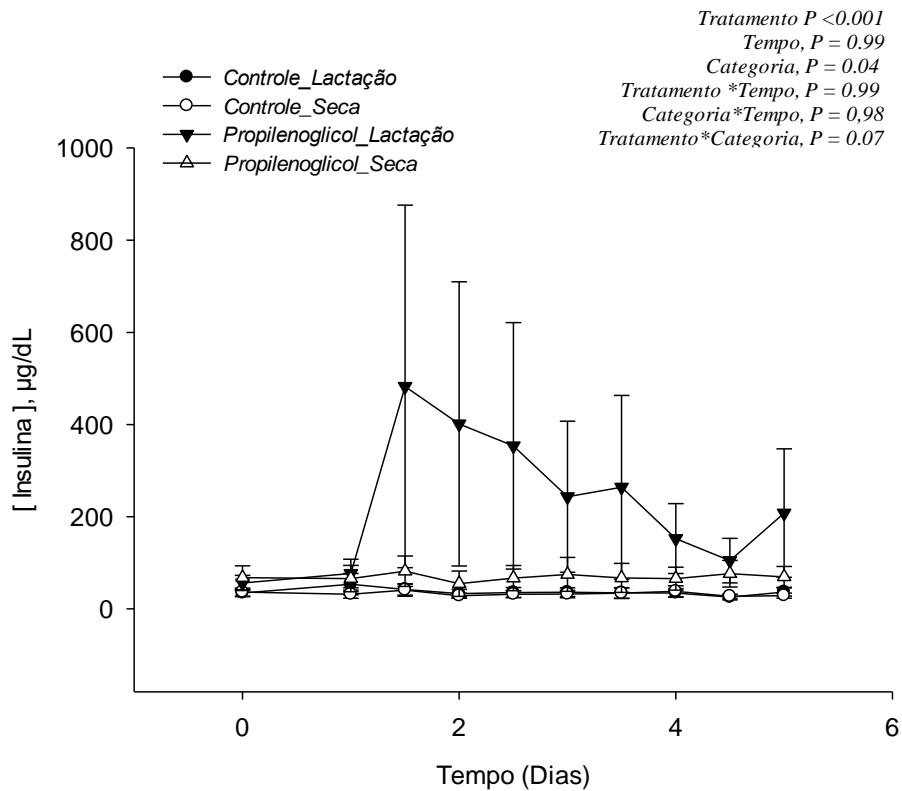
Avaliando o efeito principal dos animais tratados ou não com PPG, observa-se na Figura 10, um aumento da concentração circulante de glicose ($P=0,02$). Nota-se aumento da glicose circulante em todos os animais tratados com propilenoglicol, independentemente da categoria.

Figura 10 - Perfil de glicose circulante (Média \pm EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG). Efeito principal de tratamento.



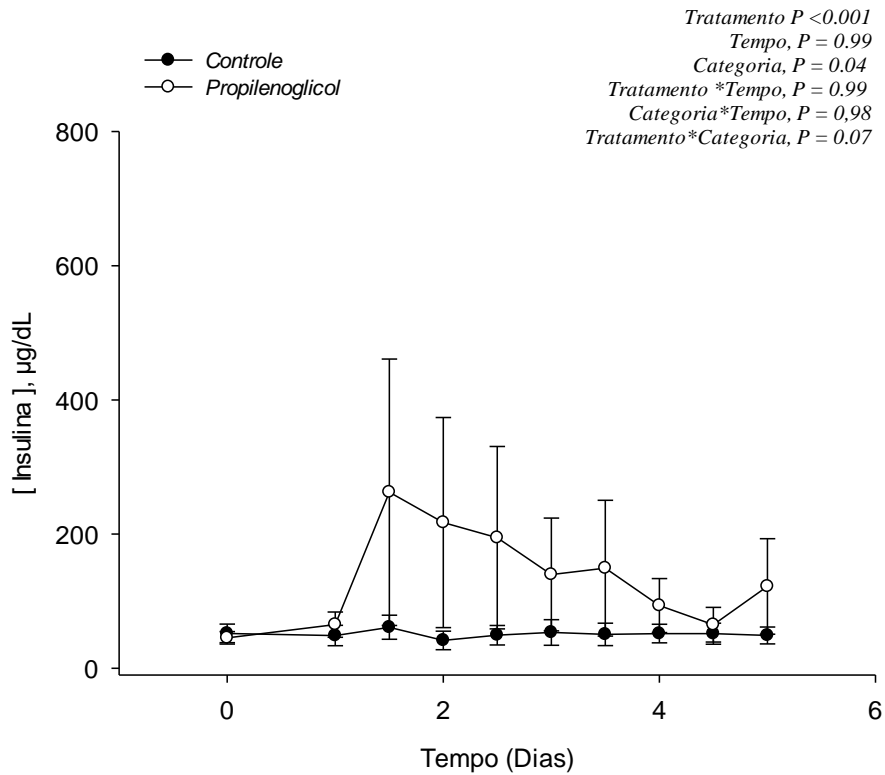
Para o perfil de insulina circulante, verificou-se efeito de tratamento ($P < 0,0001$) e de categoria ($P = 0,04$). Entretanto, não foram observadas interações Tratamento*Tempo ($P = 0,99$), Categoria*Tempo ($P = 0,98$) ou Tratamento*Categoria ($P = 0,07$). Os dados estão apresentados na Figura 11.

Figura 11 - Perfil de insulina circulante (Média \pm EPM) durante o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas por 5 dias em vacas da raça Holandesa em lactação e secas.



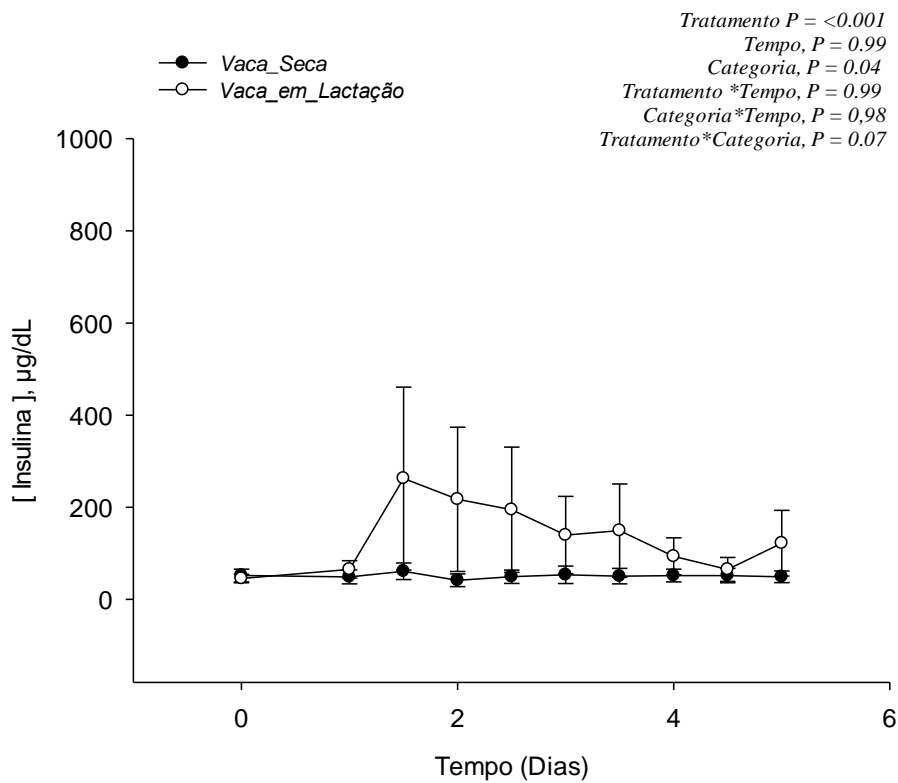
Avaliando o efeito principal de tratamento para concentração sérica de insulina Houve aumento ($P < 0,001$) da concentração circulante de insulina nos animais tratados com PPG está descrito na Figura 12.

Figura 12- Perfil de insulina circulante (Média \pm EPM) durante o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas por 5 dias em vacas da raça Holandesa em lactação e secas. Efeito principal de tratamento.



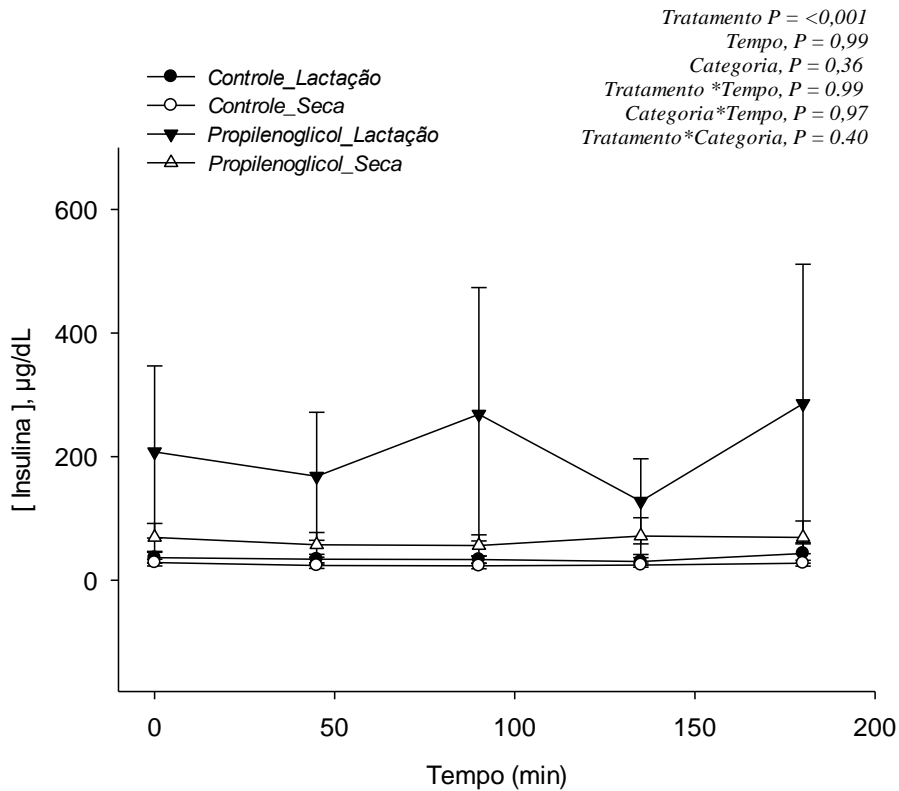
Ainda, verificou-se que vacas em lactação apresentaram maiores concentrações circulantes de insulina quando comparadas com vacas secas (Figura 13).

Figura 13- Perfil de insulina circulante (Média \pm EPM) durante o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas por 5 dias em vacas da raça Holandesa em lactação e secas. Efeito principal de categoria.



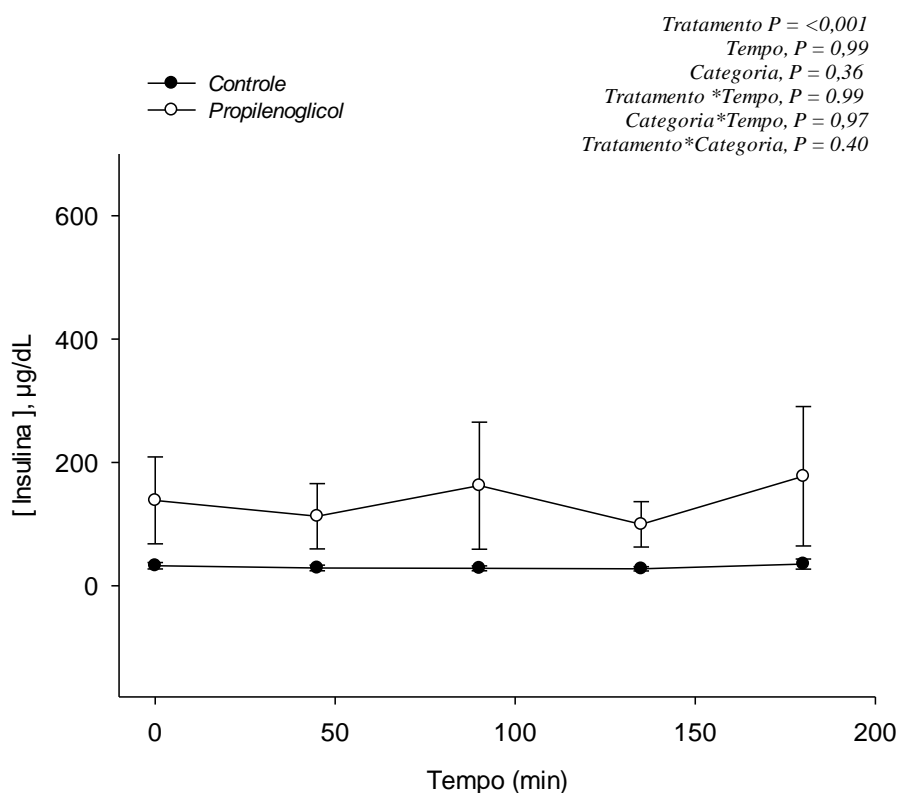
Ainda, o perfil de insulina circulante, houve aumento significativo ($P < 0,001$) da concentração de glicose sérica durante 180 minutos após o tratamento com propilenoglicol. Não houve interação Tratamento*Tempo ($P = 0,99$), Categoria*Tempo ($P = 0,97$) e Tratamento*Categoria ($P = 0,40$). Os dados estão apresentados na Figura 14.

Figura 14- Perfil de insulina circulante (Média \pm EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG).



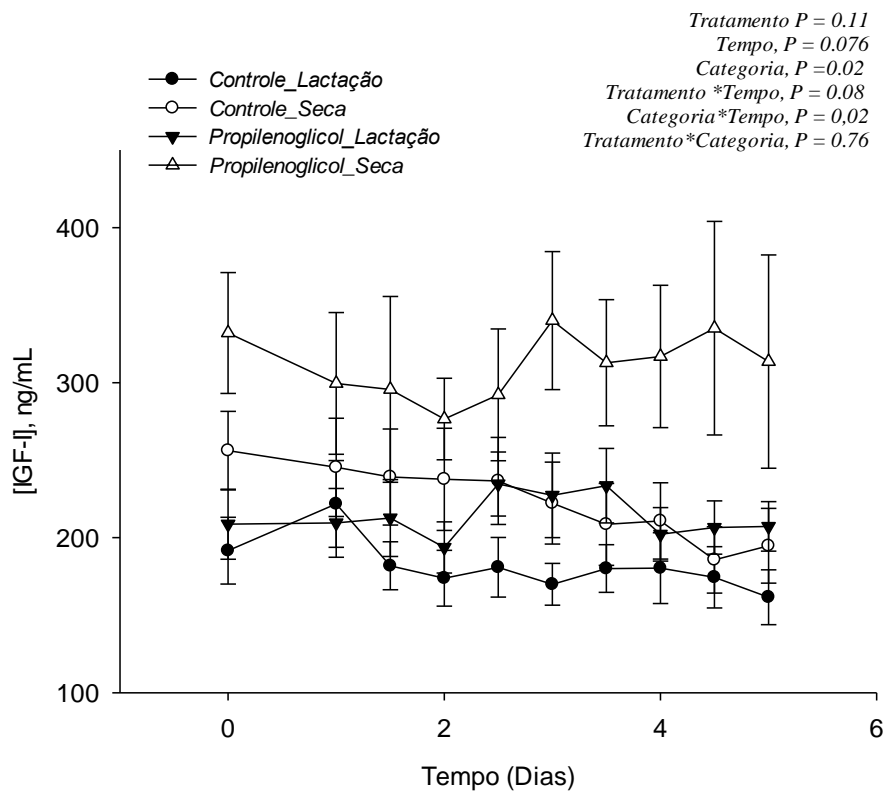
Quando avaliado o efeito de tratamento ($P < 0,001$), houve aumento da concentração de insulina sérica durante 180 minutos após o tratamento com propilenoglicol em ambas as categorias avaliadas. Estes dados são apresentados na Figura 15.

Figura 15 - Perfil de insulina circulante (Média \pm EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG), efeito principal de tratamento.



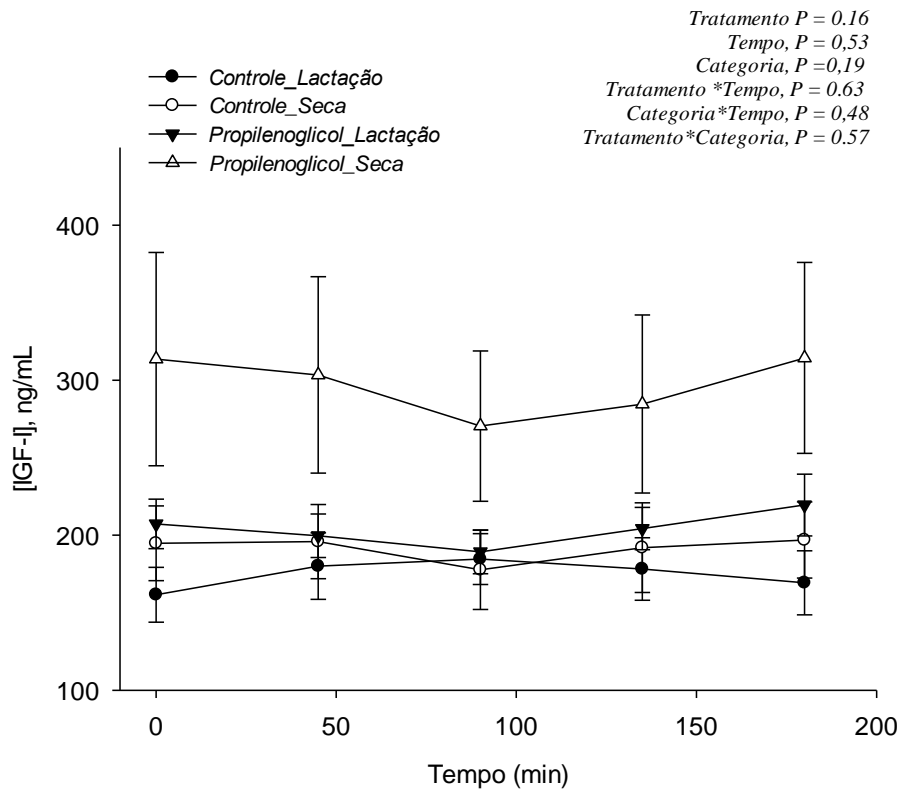
Em relação aos níveis circulantes de IGF-1, após o tratamento com propilenoglicol, verificou-se efeito de interação Categoria*Tempo ($P=0,02$) (Figura 16). Entretanto, não se verificou efeito de interação Tratamento*Tempo ($P=0,08$) e Tratamento*Categoria ($P=0,76$). As vacas tratadas com propilenoglicol apresentaram maiores concentrações circulantes de IGF-1 que as vacas em lactação ao longo do tempo.

Figura 16- Concentração plasmática de IGF-1 (Média \pm EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas suplementadas com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas durante 5 dias.



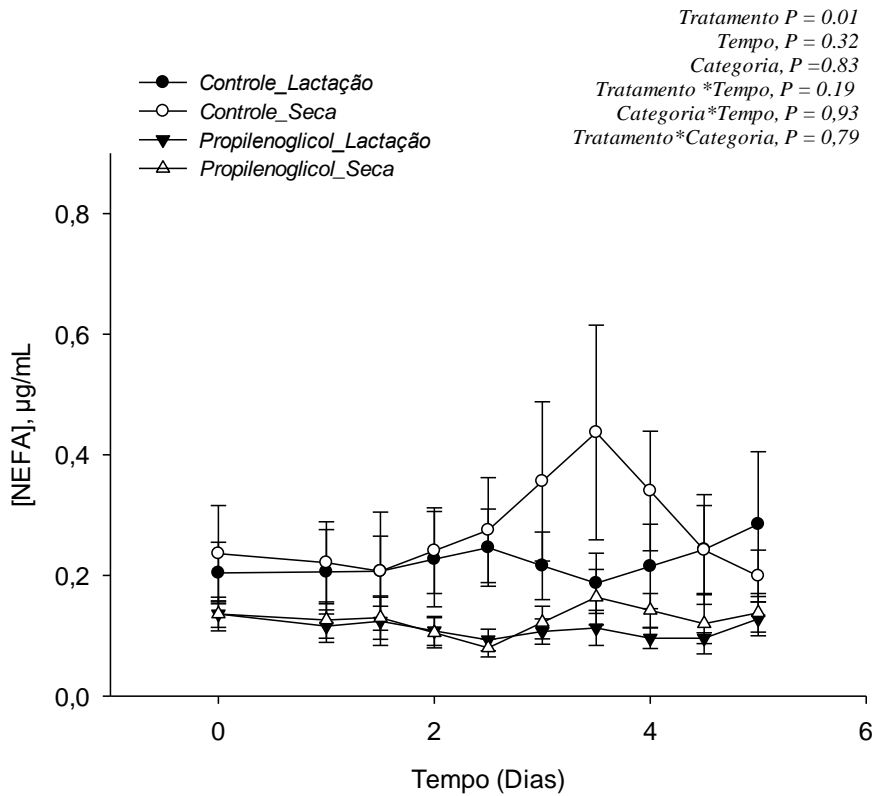
Os níveis circulantes de IGF-1, por 180 minutos após o último tratamento com propilenoglicol (dia 5), não se verificou interações tratamento*tempo ($P=0,63$), categoria*tempo ($P=0,48$) e tratamento*categoria ($P=0,57$). Também não houve diferenças significativas de tratamento ($P=0,16$), tempo ($P=0,53$) e de categoria ($P=0,19$), estes resultados são apresentados na figura .17.

Figura 17- Concentração plasmática de IGF-1 (Média \pm EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG).



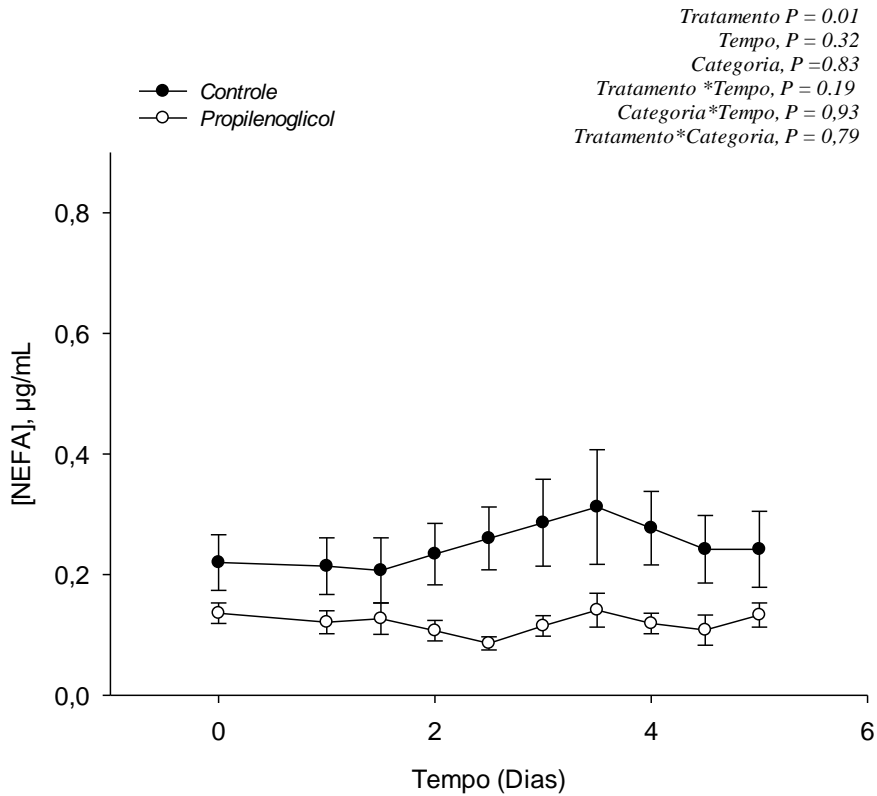
Em relação às concentrações plasmáticas de NEFA, não houve interação Tratamento*Tempo ($P=0,19$), Categoria*Tempo ($P=0,93$) ou Tratamento*Categoria ($P=0,79$), como apresentado na figura 18.

Figura 18- Concentração plasmática de NEFA (Média \pm EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas suplementadas com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas durante 5 dias.



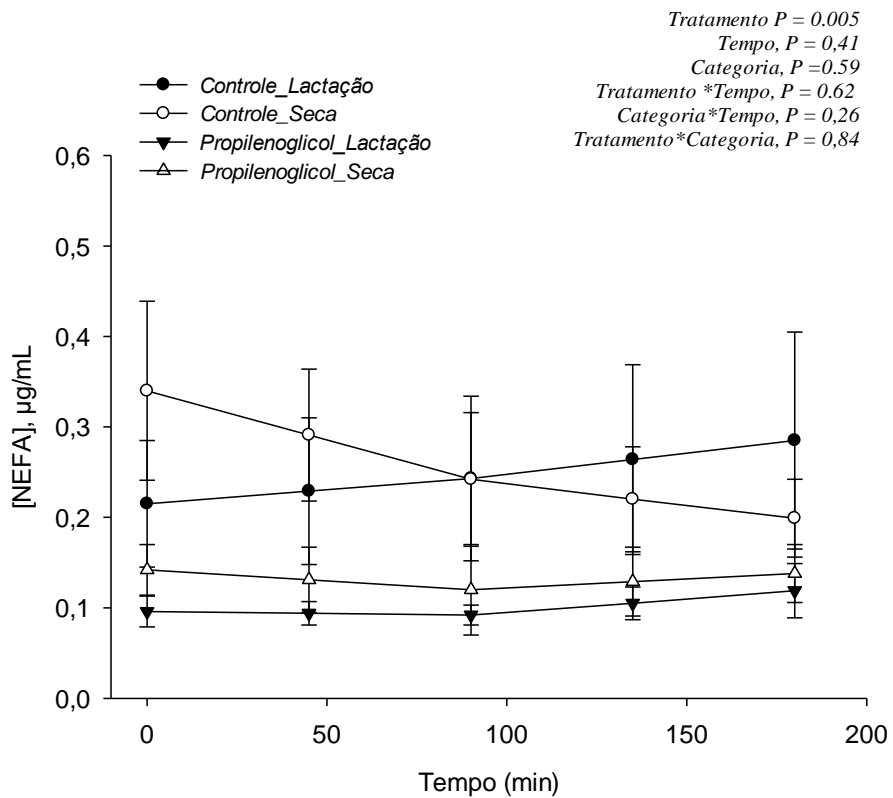
Porém, houve efeito ($P=0,01$) de tratamento, para os níveis circulantes de NEFA. Verificou-se redução das concentrações plasmáticas de NEFA nos animais tratados com PPG. Os dados estão apresentados na Figura 19.

Figura 19 - Concentração plasmática de NEFA (Média \pm EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas suplementadas com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas durante 5 dias. Efeito principal de tratamento.



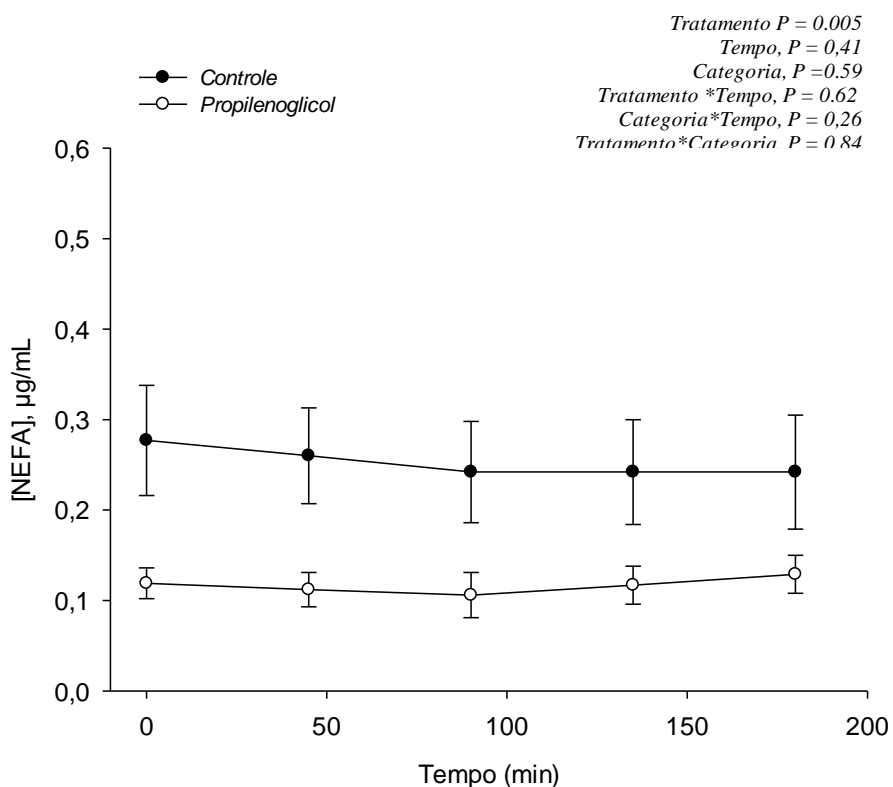
Em relação às concentrações plasmáticas de NEFA no dia 5, 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol, não houve interação Tratamento*Tempo ($P=0,62$), Categoria*Tempo ($P=0,26$) ou Tratamento*Categoria ($P=0,84$). Os dados estão apresentados na Figura 20.

Figura 20 - Concentração plasmática de NEFA (Média \pm EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG).



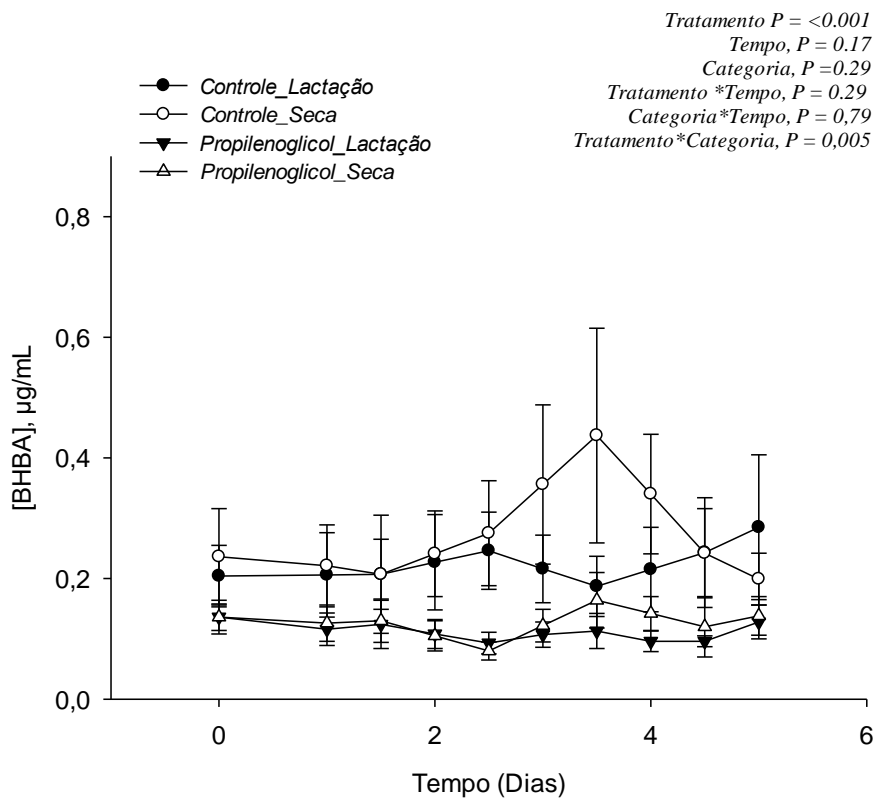
Ainda em relação as concentrações plasmáticas de NEFA 180 minutos após o tratamento com 500 mL de PPG, verificou-se efeito de tratamento ($P=0,005$), onde se observa redução nas concentrações plasmáticas de NEFA nos animais que receberam tratamento com PPG (Figura 21).

Figura 21- Concentração plasmática de NEFA (Média \pm EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG). Efeito principal de tratamento.



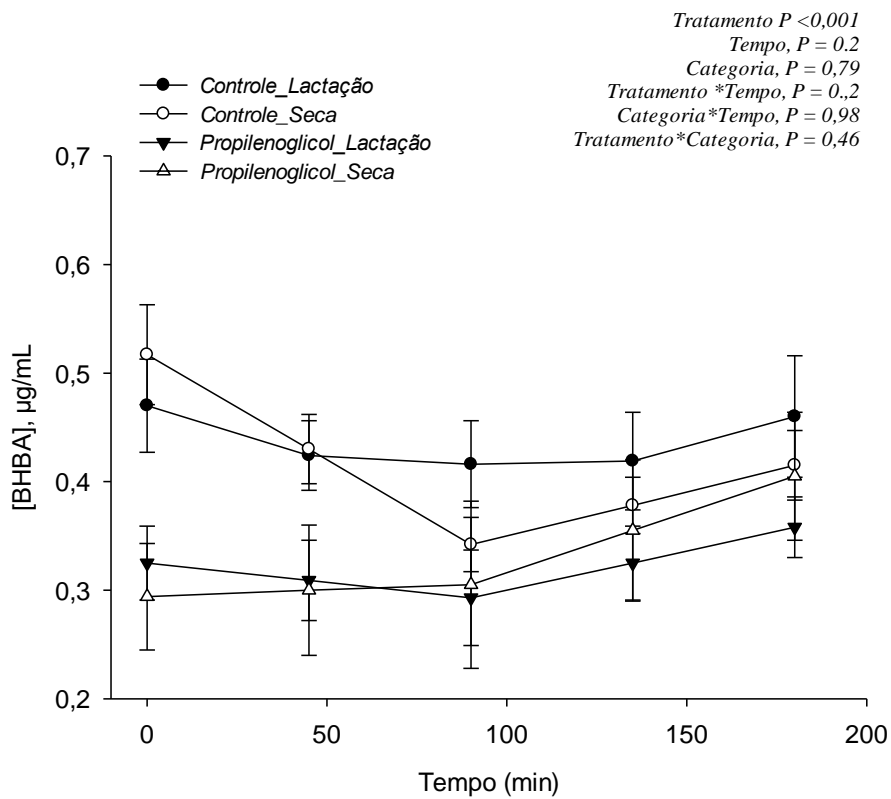
As concentrações plasmáticas de BHBA durante os 5 dias, apresentou interação Tratamento*Categoria ($P=0,005$). Verificou-se que as vacas que receberam tratamento com PPG obtiveram quantidades reduzidas desse metabólito no sangue, quando comparado com as vacas do grupo controle (Figura 22).

Figura 22- Concentração plasmática de BHBA (Média \pm EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas suplementadas com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas durante 5 dias.



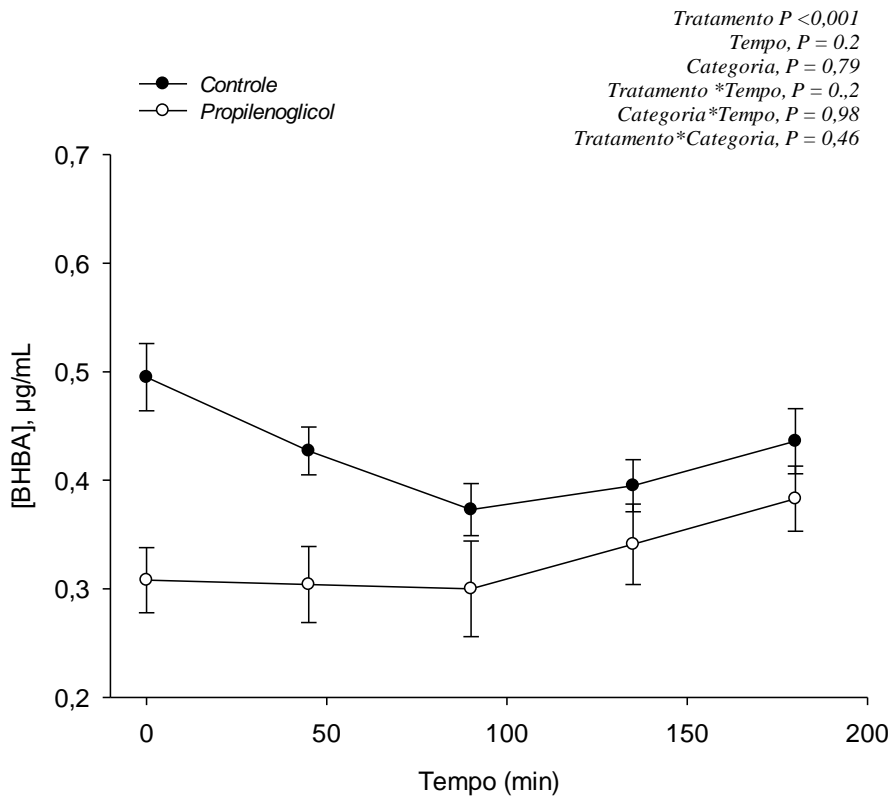
No dia 5 do tratamento, as concentrações plasmáticas de BHBA 180 minutos após o tratamento com 500 mL de PPG, não apresentaram interação Tratamento*Tempo ($P=0,2$), Categoria*Tempo ($P=0,98$) e Tratamento*Categoria ($P=0,46$), como demonstrado na Figura 23.

Figura 23- Concentração plasmática de BHBA (Média \pm EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas suplementadas com 500 mL de propilenoglicol (PPG) de 12 em 12 horas durante 5 dias.



As vacas tratadas com PPG apresentaram concentrações plasmáticas de BHBA reduzidas quando comparadas as vacas não tratadas, esses dados do efeito principal de tratamento ($P < 0,001$) estão apresentados na Figura 24.

Figura 24- Concentração plasmática de BHBA (Média \pm EPM) de vacas da raça Holandesa em lactação e secas 180 minutos após o tratamento com 500 mL de propilenoglicol (PPG). Efeito principal de tratamento.



7.2 Experimento 2 – Produção *in vitro* de embriões de fêmeas da raça Holandesa após infusão ruminal de propilenoglicol

Os dados apresentados na tabela 1 são indicativos de que as novilhas tratadas com propilenoglicol apresentaram aumento na taxa de desenvolvimento embrionário. Não se verificou efeito do tratamento para as outras variáveis.

Tabela 1 – Produção *in vitro* de embriões de novilhas da raça Holandesa lactação (*Bos taurus*) tratadas ou não com propilenoglicol (PPG) durante 5 dias antes da PIVE.

Item	Novilhas		<i>P value</i>
	Controle (n=39)	Propilenoglicol (n=38)	
Oócitos recuperados por OPU, n	5,44 ± 0,74	5,16 ± 0,62	0,8530
Oócitos viáveis, n	3,77 ± 0,54	3,18 ± 0,45	0,8002
Taxa de oócitos viáveis, % ²	62%	54%	0,1590
Clivados por OPU, n	2,33 ± 0,38	2,24 ± 0,27	0,9893
Taxa de clivagem, % ³	40%	46%	0,9474
Blastocistos por OPU	0,49 ± 0,13	0,74 ± 0,16	0,1070
Taxa de blastocistos, % ⁴	9%	14%	0,1409
Taxa de desenvolvimento embrionário, % ⁵	16%	26%	0,0583

¹Taxa de recuperação = Total de oócitos recuperados / Total de folículos puncionados; ² Taxa de clivagem = total de oócitos clivados / total de oócitos recuperados; ³ Taxa de blastocistos = total de blastocistos / Total de oócitos recuperados; ⁴ Taxa de desenvolvimento embrionário = Total de blastocistos / Total de clivados; ⁵ Os dados estão apresentados em média ± EPM. Valor-P ≤ 0,05.

Os dados apresentados na tabela 2 são indicativos de que as vacas secas tratadas com propilenoglicol apresentaram aumento na taxa de clivagem. Não se verificou efeito do tratamento para as outras variáveis analisadas no presente estudo.

Tabela 2- Produção in vitro de embriões de vacas da raça Holandesa (*Bos taurus*) secas, tratadas ou não com propilenoglicol (PPG) durante 5 dias antes da PIVE.

<i>Item</i>	Vacas secas		<i>P value</i>
	Controle (n=45)	Propilenoglicol (n=49)	
Oócitos recuperados por OPU	7,89 ± 1,21	7,12 ± 0,74	0,9840
Oócitos viáveis, n	5,09 ± 0,94	4,55 ± 0,61	0,3961
Taxa de oócitos viáveis, % ²	57%	58%	0,9062
Clivados por OPU, n	3,38 ± 0,44	3,84 ± 0,57	0,3941
Taxa de clivagem, % ³	44%	47%	0,0580
Blastocistos por OPU	1,11 ± 0,23	1,53 ± 0,39	0,4998
Taxa de blastocistos, % ⁴	16%	17%	0,1113
Taxa de desenvolvimento embrionário, % ⁵	28%	24%	0,3204

¹Taxa de recuperação = Total de oócitos recuperados / Total de folículos puncionados; ² Taxa de clivagem = total de oócitos clivados / total de oócitos recuperados; ³ Taxa de blastocistos = total de blastocistos / Total de oócitos recuperados; ⁴ Taxa de desenvolvimento embrionário = Total de blastocistos / Total de clivados; ⁵ Os dados estão apresentados em média ± EPM. Valor-P ≤ 0,05.

Os dados apresentados na tabela 3 são indicativos de que as vacas em início de lactação tratadas com propilenoglicol apresentaram aumento na taxa de clivagem ($P=0,0210$) e taxa de blastocistos ($P=0,0668$). Houve também redução do número de oócitos recuperados ($P=0,0042$). Não se verificou efeito do tratamento para as outras variáveis.

Tabela 3- Produção in vitro de embriões de vacas da raça Holandesa (*Bos taurus*) no início da lactação, tratadas ou não com propilenoglicol (PPG) durante 5 dias antes da PIVE.

Item	Vacas - Início Lactação		<i>P value</i>
	Controle (n=41)	Propilenoglicol (n=37)	
Oócitos recuperados por OPU	5,66 ± 0,69	3,7 ± 0,53	0,0042
Oócitos viáveis, n	3,0 ± 0,37	2,03 ± 0,37	0,3538
Taxa de oócitos viáveis, % ²	56%	56%	0,8214
Clivados por OPU, n	2,24 ± 0,33	2,03 ± 0,39	0,0668
Taxa de clivagem, % ³	37%	52%	0,0210
Blastocistos por OPU	0,98 ± 0,21	1,14 ± 0,19	0,8349
Taxa de blastocistos, % ⁴	18%	37%	0,0189
Taxa de desenvolvimento embrionário, % ⁵	31%	46%	0,1141

¹Taxa de recuperação = Total de oócitos recuperados / Total de folículos puncionados; ² ; ³ Taxa de clivagem = total de oócitos clivados / total de oócitos recuperados; ⁴ Taxa de blastocistos = total de blastocistos / Total de oócitos recuperados; ⁵ Taxa de desenvolvimento embrionário = Total de blastocistos / Total de clivados; ⁶ Os dados estão apresentados em média ± EPM. Valor-P ≤ 0,05.

Os dados apresentados na tabela 4 são indicativos de que as vacas em final de lactação tratadas com propilenoglicol não apresentam efeito positivo do tratamento em todas as variáveis analisadas.

Tabela 4 - Produção in vitro de embriões vacas da raça Holandesa (*Bos taurus*) final de lactação, tratadas ou não com propilenoglicol (PPG) durante 5 dias antes da PIVE.

<i>Item</i>	<i>Vacas - Final de Lactação</i>		<i>P value</i>
	Controle (n=38)	Propilenoglicol (n=36)	
Oócitos recuperados por OPU	6,00 ± 0,77	6,39 ± 0,80	0,5079
Oócitos viáveis, n	3,61 ± 0,53	3,19 ± 0,51	0,7009
Taxa de oócitos viáveis, % ²	61%	50%	0,1613
Clivados por OPU, n	3,53 ± 0,55	3,64 ± 0,60	0,8297
Taxa de clivagem, % ³	57%	55%	0,7453
Blastocistos por OPU	1,92 ± 0,36	1,83 ± 0,37	0,7841
Taxa de blastocistos, % ⁴	32%	31%	0,5283
Taxa de desenvolvimento embrionário, % ⁵	55%	48%	0,5772

¹Taxa de recuperação = Total de oócitos recuperados / Total de folículos puncionados; ; ³ Taxa de clivagem = total de oócitos clivados / total de oócitos recuperados; ⁴ Taxa de blastocistos = total de blastocistos / Total de oócitos recuperados; ⁵ Taxa de desenvolvimento embrionário = Total de blastocistos / Total de clivados; ⁶ Os dados estão apresentados em média ± EPM. Valor-P ≤ 0,05.

8 DISCUSSÃO

8.1 *Experimento 1*

O tratamento via oral com 500 mL de propilenoglicol de 12 em 12 horas por cinco dias aumentou a concentração sanguínea de glicose, em vacas em pico de lactação e vacas secas ($P=0,02$; Figura 8). Diversos estudos relatam o aumento da glicose sanguínea em vacas da raça Holandesa após tratamento com PPG (JOHNSON, 1954; PALMQUIST; BRUNENGRABER, 1997; BUTLER *et al.*, 2003; KRISTENSEN1 & RAUN, 2007; LUCY, 2012; MAURER *et al.*, 2017). Maurer *et al.* (2017) verificaram que após o tratamento oral com PPG com diferentes doses (100, 300 e 500 mL), houve um aumento na concentração sérica de glicose de vacas secas tratadas com 300 mL e 500 mL. No entanto, em vacas lactantes esse efeito foi observado somente com a dose de 500 mL. No presente estudo verificou-se aumento na concentração sanguínea de glicose dos animais tratados, entre as categorias estudadas. Outros estudos relatam limitado aumento da glicose após tratamento com diferentes doses de PPG. Verificou-se com pesquisas anteriores que o pico de insulina sérica ocorre antes do pico de glicose, o que limita aumentos consideráveis na glicose sérica (BROCKMAN; LAARVELD, 1986; CHRISTENSEN *et al.*, 1997; MIYOSHI *et al.*, 2001). A conversão do PPG em propionato no rúmen estimula a secreção de insulina pelo pâncreas. Além disso, o PPG também pode estimular diretamente a secreção de glicose pelo pâncreas (BROCKMAN, 1982). Essas informações podem explicar a resposta no aumento da insulina plasmática ($P<0,001$) após o tratamento com PPG nos animais tratados.

O aporte de glicose no fígado estimula a liberação de IGF-1 hepático, resultando em aumento considerável na concentração sérica deste fator de crescimento (BUTLER *et al.*, 2003). O tratamento com 500 mL de PPG, a cada 12 horas por cinco dias, utilizado no presente estudo, não foi eficiente ($P=0,11$) em aumentar a concentração plasmática de IGF-1. Portanto, rejeita-se a hipótese inicial de aumento nas concentrações plasmáticas de IGF-1, nos animais tratados com propilenoglicol. A concentração sérica de IGF-1 é mais alta ($P=0,02$) em vacas secas, quando comparado com vacas em lactação. Gamarra *et al.* (2014) observaram aumento de IGF-1 em novilhas suplementadas com PPG a partir do segundo dia de suplementação. Esses autores observaram que este efeito se estendeu por 7 dias após o tratamento em novilhas com restrição alimentar.

Houve aumento ($P < 0,001$) da insulina circulante no grupo suplementado com PPG em vacas em lactação, o que demonstra que o tratamento foi eficaz em aumentar a insulina sérica nesta categoria. Grummer *et al.* (1994) ao administrarem quantidades crescentes de PPG (0, 307, 613, 919 g de PPF), observaram um aumento linear na concentração sanguínea de glicose (4,17; 4,44; 4,5; 4,55 nM) e insulina (13,0; 17,7; 18,2; 19,8 $\mu\text{UI/mL}$) e uma diminuição de BHBA (0,82; 0,46; 0,35; 0,37 nM) e o NEFA (146; 425; 332; 282 $\mu\text{eq/dia}$). Esses mesmos autores concluíram que 296 mL de PPG foi tão eficaz quanto 887 mL na redução da mobilização lipídica durante a ingestão restrita de alimento, em contrapartida, o aumento da insulina foi menor com 296 mL vs. 887 mL de PPG.

É importante ressaltar que as concentrações e utilização da insulina são resultado de uma relação dinâmica entre a secreção e a excreção simultânea de outros hormônios gastrointestinais, além de ação direta dos ácidos graxos livres no ciclo de Krebs, transporte e utilização da glicose, indicando o mecanismo multifatorial de controle da insulina conforme descrito por Golay e Ybarra (2005).

Houve efeito significativo da concentração de insulina sérica tanto em vacas em lactação quanto em vacas secas, apontado que o tratamento foi eficiente em aumentar os níveis de insulina nos animais tratados com PPG ($P < 0,001$), o que indica que esses animais responderam ao aumento do aporte de glicose ruminal. Outra diferença significativa encontrada no presente estudo foi a mais alta concentração de insulina plasmática em vacas no início de lactação, indicando que estes animais necessitam de maiores concentrações de insulina para utilização da glicose. Sales (2011) em experimento a fim de caracterizar a RPI observaram a maior secreção de insulina [pico, insulina (Δ máx.) e AUC] em resposta ao tratamento com glicose, em testes de tolerância a glicose.

Estudos utilizando camundongos indicaram que o PPG e 2,3-butanodiol podem estar diretamente envolvidos na indução da resistência à insulina no músculo e no tecido adiposo, (LOMEO *et al.*, 1988; XU *et al.*, 1998). Estes achados somados a conhecida resistência periférica a insulina no início da lactação, podem explicar o aumento nas concentrações de insulina encontradas no presente estudo.

Bossaert *et al.*, em estudo utilizando novilhas e vacas em lactação da raça Holandesa, para avaliar a interferência do estado metabólico na secreção de insulina induzida pela glicose, relataram que elevadas concentrações de NEFA podem interferir negativamente na secreção de insulina pelo pâncreas.. Esse fato pode explicar a redução na resposta ao

tratamento com PPG devido à baixa concentração de NEFA (< 100 ng/mol) no início do tratamento das vacas secas.

No presente estudo, foram observadas reduções nas concentrações sanguíneas de NEFA (P=0,01) e BHBA (P=0,005) nos animais tratados com propilenoglicol. Porém, não houve interação entre o tratamento e a categoria animal para NEFA e, contrariamente, houve efeito Tratamento*Categoria para BHBA. Christensen *et al.* (1997) relataram que a baixa concentração de NEFA (< 100 ng/mol) antes do tratamento com PPG indica baixo desafio metabólico hepático em vacas secas, e corroborando com essa afirmação, os animais utilizados para o presente estudo apresentaram concentração média de NEFA acima de 100 ng/mol. O baixo desafio metabólico (produção média de 30±5 kg de leite/dia) dos animais em lactação utilizados no presente estudo, que pode ser observado a partir dos níveis basais de insulina, glicose, NEFA e BHBA, não apresentaram grandes diferenças entre vacas secas e em lactação antes do início do tratamento.

Verificou-se, também, aumento da glicose circulante nos animais tratados com PPG, o que pode explicar a redução nas concentrações plasmáticas de NEFA e BHBA. Resultados conflitantes são encontrados na literatura, uma vez que Studer *et al.* (1993) mostraram que o tratamento com PPG no período pré-parto tende a afetar a concentração plasmática de NEFA no período pós-parto. No entanto, Lucy (2008) relatou que concentração de NEFA no plasma têm limitada influência do tratamento com PPG, e os pesquisadores Bjerre-Harpoth *et al.* (2015) observaram que as concentrações plasmáticas de NEFA diferiram apenas entre os tratamentos na primeira semana após o parto. O efeito gliconeogênico do PPG é mais evidente em vacas que se encontram com ECC alto no momento do parto, porém, verificou-se que esses efeitos parecem ser reduzidos em animais com baixas concentrações de NEFA e BHBA no periparto (NIELSEN; INGARTSEN, 2004).

Nielsen e Ingartsen (2004) relataram que o tratamento com PPG reduz a metabolização de gordura em vacas no início de lactação (até a segunda semana). Alguns estudos não encontraram esses efeitos de redução da metabolização da gordura, enquanto outros confirmaram esses achados (GRUMMER *et al.*, 1994; CHRISTENSEN *et al.*, 1997). A variabilidade dos resultados encontrados pode ser explicada por alguns fatores como: tempo de coleta de sangue em relação ao tratamento com PPG, via de administração, status fisiológico do animal e dose de PPG utilizada (COZZI *et al.*, 1996; FORMIGONI *et al.*, 1996; FONSECA *et al.*, 1998; MIYOSHI *et al.*, 2001; PICKETT *et al.*, 2003).

Bjerre-Harpøth *et al.* (2015) verificaram que o rápido aumento nas concentrações de glicose após o tratamento com PPG reduz momentaneamente os níveis plasmáticos de NEFA e BHBA. Esse efeito leva a redução de glicose e aumento do pico plasmático de BHBA, que retornam rapidamente à níveis normais após o tratamento.

Um fator importante observado nos parâmetros avaliados no nosso estudo é que não houve padrão de resposta dos animais submetidos à suplementação com PPG, uma vez que todas as variáveis avaliadas apresentaram alto desvio padrão.

8.2 Experimento 2

O tratamento com PPG apresentou alguns resultados positivos no aumento das taxas de PIVE. Verificou-se aumento ($P=0,06$) na taxa de desenvolvimento embrionário em novilhas tratadas com PPG (Tabela 1). Gamarra *et al.* (2014) em estudo utilizando 400 mL de PPG em novilhas da raça Holandesa com restrição alimentar, verificaram maior número de blastocistos grau 1 a 3 quando comparadas as novilhas não tratadas. Esses resultados sugerem que o tratamento com PPG pode melhorar a competência oocitária, resultando em maiores taxas de desenvolvimento embrionário e qualidade dos blastocistos produzidos.

Outros estudos indicam que diferentes planos nutricionais com elevados níveis de energia podem afetar o crescimento folicular (GUTIERREZ *et al.*, 1997; GONG *et al.*, 2002) por induzir mudanças nos metabólitos, insulina e IGF-1 no plasma (ARMSTRONG *et al.*, 2001). Além disso, estudos verificaram alterações hormonais e de fatores de crescimento também no fluido folicular conforme o nível de energia da dieta (LANDAU *et al.*, 2000; MATOBA *et al.*, 2014). O'Callaghan *et al.* (2000) relataram que a dieta pode afetar a morfologia e a capacidade de desenvolvimento embrionário, apesar de não apresentar melhora na qualidade oocitária e nas alterações metabólicas e hormonais. Entretanto, os autores discutem que a dieta pode ter influenciado na disponibilidade de glicose para o desenvolvimento embrionário.

Em vacas secas verificou-se efeito ($P=0,580$) de aumento na taxa de clivagem (44% vs 47%) nos animais tratados com PPG, em estudo realizado com aumento da insulina em cultura de folículos entre 4 e 8 mm. Fouladi-Nashta *et al.* (2006) concluíram que o aumento de insulina no meio de cultivo reduz a taxa de clivagem (61 vs. 51%), porém, sem influência negativa no desenvolvimento embrionário. Nesse mesmo sentido não foram observadas diferenças nas outras variáveis analisadas (Tabela 2) no presente estudo. Outros estudos evidenciaram que devido ao baixo desafio metabólico, vacas secas são mais eficientes na produção *in vitro* de embriões quando comparadas com vacas em lactação (VIEIRA *et al.*, 2015) e com novilhas (GUERREIRO, 2015; BARUSELLI *et al.*, 2016).

Os resultados apresentados na Tabela 3 apontam aumento significativo ($P=0,0189$) na taxa de blastocistos das vacas em início de lactação pertencentes ao grupo de animais tratados com PPG (18% vs. 37%). Ainda que o período de tratamento com PPG seja curto (5 dias), foi observado melhora na qualidade oocitária demonstrada pela taxa de blastocistos.

Houve redução no número de oócitos recuperados por OPU nos animais tratados quando comparado aos animais não tratados (5,66 vs. 3,7; $P=0,0042$). Porém, não houve diferenças no número de embriões produzidos conforme o tratamento com PPG. Rizos *et al.* (2008), em estudo com 35 vacas no início de lactação tratadas com 500 mL de PPG por 4 semanas, não observaram diferenças significativas na taxa de blastocisto entre os animais tratados ou não com PPG (25,3% vs. 14,4%). Entretanto, estes autores discutem a diferença numérica em favor do grupo tratado com PPG. Britt (1994) relata que vacas em BEN possuem alteração na expressão gênica dos oócitos desenvolvidos neste período, e essas alterações resultam em oócitos com baixa capacidade de desenvolvimento embrionário. Os resultados do presente estudo corroboram com o efeito positivo do aumento de aporte de glicose na PIVE de vacas no início de lactação.

Não foram observadas diferenças na eficiência de produção de embriões em vacas em fim de lactação tratadas com PPG (Tabela 4). Estudos apontam que essa categoria animal apresenta elevadas concentrações de glicose circulante, o que pode justificar a resposta ao tratamento encontrada no presente estudo (SAUER *et al.*, 1973; GRUMMER *et al.*, 1994).

9 CONCLUSÃO

Os resultados do estudo confirmam a hipótese de que o tratamento com propilenoglicol eleva os níveis séricos de glicose, insulina e reduz a quantidade de NEFA e BHBA em vacas no início de lactação, Entretanto, a hipótese de que haveria aumento de IGF-1 foi rejeitada.

O tratamento com 500 mL de propilenoglicol duas vezes ao dia, aumenta a taxa de desenvolvimento embrionário em novilhas, a taxa de blastocisto em vacas no início de lactação, e a taxa de clivagem em vacas secas. Em vacas no final de lactação, não foram observados efeitos positivos do tratamento com propilenoglicol na produção *in vitro* de embriões.

O tratamento com propilenoglicol pode ser utilizado como ferramenta para aumento da eficiência na PIVE, através do aumento do aporte energético em vacas no início de lactação e novilhas da raça holandesa.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS

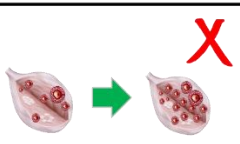
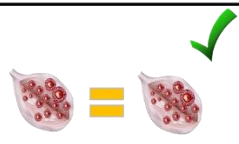
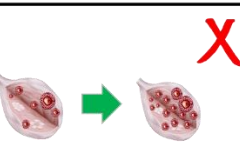
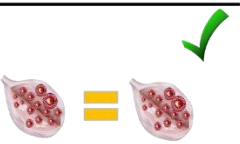
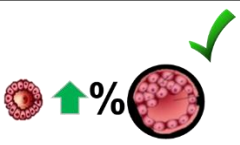
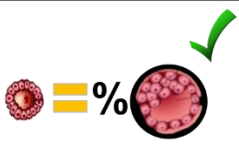
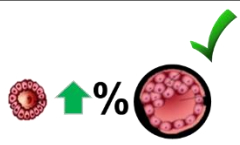
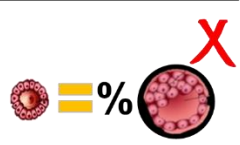
O tratamento com PPG pode ser uma alternativa para melhorar a qualidade embrionária e a produção *in vitro* de embriões em vacas no início de lactação e em novilhas. Essas categorias geralmente apresentam baixa eficiência na aplicação dessa biotecnologia da reprodução.

A seguir é apresentado a confirmação ou não das hipóteses propostas pelo presente estudo:

Figura 25 - (A) Experimento 1: O tratamento com propilenoglicol aumentou o aporte de glicose e estimulou o aumento da concentração circulante de insulina. Entretanto, não se verificou aumento esperado nas concentrações de IGF-1. Ainda, o tratamento com propilenoglicol reduziu a mobilização de gordura corporal, observada pela redução de NEFA e BHBA circulantes. (B) Experimento 2: O tratamento com propilenoglicol proporcionou aumento do aporte energético mas não se verificou efeito no número de oócitos viáveis aspirados. Porém, o tratamento com PPG apresentou efeito positivo na PIVE de vacas em início de lactação e de novilhas

	LACTANTES INÍCIO DE LACTAÇÃO		NÃO LACTANTES VACAS SECAS	
	CONTROLE	PPG	CONTROLE	PPG
GLICOSE	= ✓	+ ✓	= ✓	+ ✓
INSULINA	= ✓	+ ✓	= ✓	= ✗
IGF-1	= ✓	+ ✗	= ✓	= ✓
BHBA	= ✓	- ✓	= ✓	= ✓
NEFA	= ✓	- ✓	= ✓	= ✗

(A) Experimento 1

	LACTANTES		NÃO LACTANTES	
	INÍCIO	FINAL	NOVILHAS	SECAS
Quantidade	 ✗	 ✓	 ✗	 ✓
Qualidade	 ✓	 ✓	 ✓	 ✗

(B) Experimento 2

BIBLIOGRAFIA

ACCORSI, P. A.; GOVONI, N.; GAIANI, R.; PEZZI, C.; SEREN, E.; TAMANINI, C. Leptin, GH, PRL, insulin and metabolic parameters throughout the dry period and lactation in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 3, p. 217–223, 2005.

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

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

ALILEW-WONDIM, D.; FOURNIER, E.; HOELKER, M.; SAEED-ZIDANE, M.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; NEUHOFF, C.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; RINGS, F.; GAGNÉ, D.; SIRARD, M. A.; ROBERT, C.; SHOJAEI SAADI, H. A.; GAD, A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts developed in vivo from embryos completed different stages of development in vitro. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–31, 2015.

ALVAREZ, P.; SPICER, L. J.; CHASE, C. C.; PAYTON, M. E.; HAMILTON, T. D.; STEWART, R. E.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; WETTEMANN, R. P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 5, p. 1291–1302, 2000.

ANDRADE-OLIVEIRA, V.; CAMARA, N. O. S.; MORAES-VIEIRA, P. M. Adipokines as Drug Targets in Diabetes and Underlying Disturbances. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, article ID 681612, 2015.

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

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

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

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

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N.; GIMENES, L. U.; SA FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; RODRIGUES, C. A.; BO, G. A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1583–1593, 2011a.

- BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; VIEIRA, L. M.; MENDANHA, M. F.; BÓ, G. a. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 47 Suppl 4, p. 134–41, ago. 2012.
- BARUSELLI, P. S.; VIEIRA, L. M.; SA FILHO, M. F.; MINGOTI, R. D.; FERREIRA, R. M.; CHIARATTI, M. R.; OLIVEIRA, L. H.; SALES, J. N.; SARTORI, R. Associations of Insulin Resistance Later in Lactation on Fertility of Dairy Cows. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 263–269, jul. 2016.
- BAUMAN, D. E.; BRUCE CURRIE, W. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 9, p. 1514–1529, 1980
- BEAM, S. W.; BUTLER, W. R. Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 1, p. 121–131, jan. 1998.
- BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 9, p. 2804–2819, set. 1995.
- BHATTACHARYA, I.; DOMINGUEZ, A. P.; DRAGERT, K.; HUMAR, R.; HAAS, E.; BATTEGAY, E. J. Hypoxia potentiates tumor necrosis factor- α induced expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in white and brown adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 461, n. 2, p. 287–292, maio 2015.
- BONNEVILLE-HÉBERT, A.; BOUCHARD, E.; TREMBLAY, D. Du; LEFEBVRE, R. Effect of reproductive disorders and parity on repeat breeder status and culling of dairy cows in Quebec. **Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire**, v. 75, n. 2, p. 147–51, abr. 2011.
- BOSSAERT, P.; LEROY, J. L. M. R.; DE CAMPENEERE, S.; DE VliegHER, S.; OPSOMER, G. Differences in the glucose-induced insulin response and the peripheral insulin responsiveness between neonatal calves of the Belgian Blue, Holstein-Friesian, and East Flemish breeds. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 9, p. 4404–4411, 2009a.
- BOSSAERT, P.; LEROY, J. L. M. R.; DE CAMPENEERE, S.; DE VliegHER, S.; OPSOMER, G. Differences in the glucose-induced insulin response and the peripheral insulin responsiveness between neonatal calves of the Belgian Blue, Holstein-Friesian, and East Flemish breeds. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 9, p. 4404–4411, set. 2009b.
- BOSSAERT, P.; LEROY, J. L. M. R.; DE VliegHER, S.; OPSOMER, G. Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 9, p. 3363–3371, set. 2008.
- BOURA-HALFON, S.; ZICK, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 4, p. E581–E591, 2009a.
- BOURA-HALFON, S.; ZICK, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 296, p. E581–E591, 2009b.
- BRITT, J. H. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. **The Bovine Practitioner Proceeding**, v.24, p. 39-43, 1991.

- BROCKMAN, R. P.; LAARVELD, B. Hormonal regulation of metabolism in ruminants: a review. **Livestock Production Science**, v. 14, n. 4, p. 313–334, 1986.
- BULMAN, D. C.; LAMMING, G. E. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, n. 2, p. 447–458, 1 nov. 1978
- BUTLER, S. T.; MARR, A. L.; PELTON, S. H.; RADCLIFF, R. P.; LUCY, M. C.; BUTLER, W. R. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. **Journal of Endocrinology**, v. 176, n. 2, p. 205–217, 2003.
- BUTLER, W. R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 449–457, 2000.
- BYATT, J. C.; EPPARD, P. J.; VEENHUIZEN, J. J.; CURRAN, T. L.; CURRAN, D. F.; MCGRATH, M. F.; COLLIER, R. J. Stimulation of mammogenesis and lactogenesis by recombinant bovine placental lactogen in steroid-primed dairy heifers. **Journal of Endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 33–43, 1 jan. 1994.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 419-425, ago. 2002 .
- CHASSAGNE, M.; BARNOUIN, J.; CHACORNAC, J. P. Risk factors for stillbirth in holstein heifers under field conditions in france: A Prospective Survey. **Theriogenology**, v. 51, n. 8, p. 1477–1488, jun. 1999.
- CHI, M. M.; SCHLEIN, A. L.; MOLEY, K. H. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. **Endocrinology**, v. 141, n. 12, p. 4784–4792, dez. 2000.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; FAULCONNIER, Y.; BONNET, M.; ROUEL, J.; BOCQUIER, F. Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, n. 1, p. 127–134, fev. 2000.
- COLLIER, R. J. J.; BAUMAN, D. E. E.; HAYS, R. L. L. Milk production and reproductive performance of cows hormonally induced into lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 10, p. 1524–1527, 14 set. 1975
- COLLIER, R. J.; MCNAMARA J. P.; WALLACE C. R.; DEHOFF M. H.. A review of endocrine regulation of metabolism during lactation. **Journal of Animal Science**. V.59:p.498–510; 1984.
- COTILLARD, A.; POITOU, C.; TORCIVIA, A.; BOUILLLOT, J.-L.; DIETRICH, A.; KLOTING, N.; GREGOIRE, C.; LOLMEDE, K.; BLUHER, M.; CLEMENT, K. Adipocyte size threshold matters: link with risk of type 2 diabetes and improved insulin resistance after gastric bypass. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 8, p. E1466-70, ago. 2014.
- CRESCENZO, R.; BIANCO, F.; MAZZOLI, A.; GIACCO, A.; CANCELLIERE, R.; DI FABIO, G.; ZARRELLI, A.; LIVERINI, G.; IOSSA, S. Fat quality influences the obesogenic effect of high fat diets. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9475–9491, nov. 2015.

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

DE KOSTER, J. D., and OPSOMER G.. Insulin resistance in dairy cows. **Vet. Clin. North Am. Food Animal. Practice**. v.322, p.29299–322, 2013.

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

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

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

FERNÁNDEZ-JULIÁN. Isopropanolic Cimicifuga racemosa is favorable on bone markers but neutral on an osteoblastic cell line. **Osteoporosis International**, v. 4, n. 1, p. 337–342, 2009. >.

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

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

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

FOWLER, P. A.; FOSTER, M. A., KNIGHT, C. H. In-vivo magnetic resonance imaging studies of mammatogenesis in non-pregnant goats treated with exogenous steroids. **Journal of Dairy Research**, v. 58, n. 2, 151-7, 1991.

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

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

FREITAS, P. R. C.; COELHO, S. G.; RABELO, E.; LANA, Â. M. Q.; ARTUNDUAGA, M. A. T.; SATURNINO, H. M. Artificial induction of lactation in cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 10, p. 2268–2272, out. 2010.

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

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

GILLAND, B. World population and food supply: can food production keep pace with population growth in the next half-century? **Food Policy**, v. 27, n. 1, p. 47–63, 2002

GOLAY, A., and BARRA J. Y... Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* V.19, p. 649–663, 2005.

GONG, J. G.; BAXTER, G.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. **J Reprod Fertil**, v. 110, n. 1, p. 91–97, 1997.

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

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

GRADEN, A. P.; OLDS, D.; MOCHOW, C. R.; MUTTER, L. R. Causes of fertilization failure in repeat breeding cattle. **J Dairy Sci**, v. 51, n. 5, p. 778–781, 1968.

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

GUSTAFSSON, H. Characteristics of embryos from repeat breeder and virgin heifers. **Theriogenology**, v. 23, n. 3, p. 487–498, 1985.

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

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

HANCOCK, J.; BRUMBY, P. J.; TURNER, C. W. Hormonal induction of lactation in identical twin dairy cattle. **New Zealand Journal of Science and Technology**, v. 36, p. 111–116, 1954.

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

- HEUER, C.; SCHUKKEN, Y. H.; DOBBELAAR, P. Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 295–304, fev. 1999.
- HOLTENIUS, P.; HOLTENIUS, K. A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 49, n. 1, p. 29, 2007.
- HOLTENIUS, P.; HOLTENIUS, K. A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 49, n. 1, p. 3–5, 2007.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and Metabolic Disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, dez. 2006.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A.; ELLIS, R.; WHITE, M. F.; SPIEGELMAN, B. M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-Alpha-and obesity-induced insulin resistance. **Science**, New York, v. 271, n. 5249, p. 665–668, fev. 1996.
- IGWEBUIKE, U. M. Trophoblast cells of ruminant placentas: a minireview. **Animal Reproduction Science**, v. 93, n. 3–4, p. 185–198, 2006.
- INGVARTSEN, K. L. & ANDERSON J. B.. Integration of metabolism and intake regulation: A review focusing on periparturient animals. **Journal of Dairy Science** v.83; p.1573-1597; 2000.
- JEWELL, T. **Artificial induction of lactation in nonbreeder dairy cows**. 2002. Dissertação (Mestrado) - Virginia Polytechnic Institute (Virginia Tech), University of Virginia, S.I. 2002.
- JIANG, Z. Y.; LIN, Y. W.; CLEMONT, A.; FEENER, E. P.; HEIN, K. D.; IGARASHI, M.; YAMAUCHI, T.; WHITE, M. F.; KING, G. L. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 4, p. 447–457, ago. 1999.
- KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 4, p. 473–481, ago. 2000.
- KAHN, C. R. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. **Metabolism**, v. 27, 1978.
- KENDRICK, K. W., T. L. BAILEY, A. S. GARST, A. W. PRYOR, A. MADZADEH, R. M. AKERS, W. E. EYESTONE, R. E. PEARSON, and F. C. GWAZDAUSKAS.. Effects of energy balance of hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. **Journal of Dairy Science**. V.82; p.1731–1741; 1999.
- KENSINGER, R. S.; BAUMAN, D. E.; COLLIER, R. J. Season and treatment effects on serum prolactin and milk yield during induced lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 12, p. 1880–1888, dez. 1979.
- KLOTING, N.; BLUHER, M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 15, n. 4, p. 277–287, dez. 2014.
- KOSACKA, J.; KERN, M.; KLOTING, N.; PAESCHKE, S.; RUDICH, A.; HAIM, Y.; GERICKE, M.; SERKE, H.; STUMVOLL, M.; BECHMANN, I.; NOWICKI, M.; BLUHER, M. Autophagy in adipose tissue of patients

with obesity and type 2 diabetes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 409, p. 21–32, jul. 2015.

KRISTENSEN, N. B.; RAUN, B. M. L. Ruminal and intermediary metabolism of propylene glycol in lactating Holstein cows. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 10, p. 4707–4717, 2007.

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

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

LARRY SMITH, K.; SCHANBACHER, F. L. Hormone induced lactation in the bovine. I. lactational performance following injections of 17β -estradiol and progesterone. **Journal of Dairy Science**, v. 56, n. 6, p. 738–743, 14 set. 1973.

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

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

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

LEIVA, T.; COOKE, R. F.; BRANDÃO, A. P.; ABOIN, A. C.; RANCHES, J.; VASCONCELOS, J. L. M.,. Effects of excessive energy intake and supplementation with chromium propionate on insulin resistance parameters, milk production, and reproductive outcomes of lactating dairy cows. **Livestock Science**. v.80, p.121–128, 2015.

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

LEIVA, T.; COOKE, R. F.; BRANDÃO, A. P.; ABOIN, A. C.; RANCHES, J.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of excessive energy intake and supplementation with chromium propionate on insulin resistance parameters, milk production, and reproductive outcomes of lactating dairy cows. **Livestock Science**, v. 180, p. 121–128, 2015

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

LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P. E. J.; DE KRUIF, A. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 201–211, 2004.

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

LOTNICK, G. D.; CORRETTI, M. C.; VOGEL, R. A. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium—dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *JAMA*, v. 278, n. 20, p. 1682–1686, 26 nov. 1997.

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

MAEDLER, K., SPINAS, G. A., DYNTER D., MORITZ W., KAISER N., and M. Y. DONATH.. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function. **Diabetes** v.76, p.50-69, 2001.

MATAMOROS, I. A.; COX, N. M.; MOORE, A. B. Effects of exogenous insulin and body condition on metabolic hormones and gonadotropin-induced follicular development in prepubertal gilts. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 5, p. 2081–2091, 1 maio 1991.

MATIKAINEN, N.; TASKINEN, M.-R. Postprandial triglyceride-rich lipoproteins in insulin resistance and type 2 diabetes. **Future Lipidology**, v. 3, n. 5, p. 531–543, 2008.

MELLADO, M.; ANTONIO-CHIRINO, E.; MEZA-HERRERA, C.; VELIZ, F. G.; AREVALO, J. R.; MELLADO, J.; DE SANTIAGO, A. Effect of lactation number, year, and season of initiation of lactation on milk yield of cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 9, p. 4524–30, set. 2011.

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

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

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

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

OIKAWA, S.; OETZEL, G. R. Decreased Insulin Response in Dairy Cows Following a Four-Day Fast to Induce Hepatic Lipidosis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 8, p. 2999–3005, 2006.

OLIVEIRA, L. H.; NASCIMENTO, A. B.; MONTEIRO, P. L. J. J.; GUARDIEIRO, M. M.; WILTBANK, M. C.; SARTORI, R. Development of insulin resistance in dairy cows by 150 days of lactation does not

- alter oocyte quality in smaller follicles. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 11, p. 9174–9183, nov. 2016.
- OLIVEIRA, Louise Helen de. Associação da insulina circulante com a função ovariana e qualidade oocitária em vacas holandesas. 2016. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.
- PANTALEON, M.; KAYE, P. L. Glucose transporters in preimplantation development. *Reviews of Reproduction*, v. 3, n. 2, p. 77–81, maio 1998.
- PINEDO, P. J.; DE VRIES, A. Effect of days to conception in the previous lactation on the risk of death and live culling around calving. *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 3, p. 968–977, 2010.
- PIRES, J. A. A.; PESCARA, J. B.; GRUMMER, R. R. Reduction of plasma NEFA concentration by nicotinic acid enhances the response to insulin in feed-restricted holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 10, p. 4635–4642, out. 2007.
- REAVEN, G. M. Role of Insulin resistance in human disease. *Diabetes*, v. 37, n. 12, p. 1595 LP-1607, 1 dez. 1988.
- REAVEN, G. M. The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. *Annual Review of Nutrition*, v. 25, n. 1, p. 391–406, 12 jul. 2005.
- RODRIGUES H.; FERREIRA A. A.; MANCILHA, R. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S., C A.; AYRES, R. M. . T. Comparação entre a taxa de concepção após inseminação artificial ou a transferência de embriões em vacas Holandesas de alta produção repetidoras de serviço. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 21., 2007, Araxá, MG. Anais... 2007.
- SALES, J. N. S.; IGUMA, L. T.; BATISTA, R. I. T. P.; QUINTAO, C. C. R.; GAMA, M. A. S.; FREITAS, C.; PEREIRA, M. M.; CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI, P. S. Effects of a High-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *bos indicus* and *bos taurus* cows. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 5, p. 3086–3099, maio 2015.
- SALES, JOSÉ NÉLIO DE SOUSA. Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus*. 2011. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology*, v. 69, n. 1, p. 88–97, 2008.
- SASAKI, S. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. *Animal Science Journal*, v. 73, n. 6, p. 423–433, 2002.
- SHAH, M.; ADAMS-HUET, B.; BRINKLEY, L.; GRUNDY, S. M.; GARG, A. Lipid, glycemic, and insulin responses to meals rich in saturated, cis-monounsaturated, and polyunsaturated (n-3 and n-6) fatty acids in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, v. 30, n. 12, p. 2993–2998, dez. 2007.
- SILVA, LUIZ ANTÔNIO DA. Causas de descarte de vacas da raça holandesa confinadas em uma população de 2.083 bovinos (2000–2003). *Ciência Animal Brasileira*, UFG, v. 9, n. 2, 2008.

- SIMPSON, R. B.; CHASE, C. C.; SPICER, L. J.; VERNON, R. K.; HAMMOND, A. C.; RAE, D. O. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 102, n. 2, p. 483–492, 1994.
- SINCLAIR, K. D. Declining fertility, insulin resistance and fatty acid metabolism in dairy cows: Developmental consequences for the oocyte and pre-implantation embryo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 38, n. SUPPL. 2, p. 545–558, 2010.
- SINCLAIR, K. D., ROOKE J. A., and MCEVOY T. G... Regulation of nutrient uptake and metabolism in pre-elongation ruminant embryos. **Reproduction. Supplement.** v.61, p.371–385. 2003 .
- SKURK, T.; ALBERTI-HUBER, C.; HERDER, C.; HAUNER, H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 92, n. 3, p. 1023–1033, mar. 2007.
- SMITH, T. R.; HIPPEN, A. R.; BEITZ, D. C.; YOUNG, J. W. Metabolic characteristics of induced ketosis in normal and obese dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 80, n. 8, p. 1569–1581, ago. 1997.
- STECKHAN, N.; HOHMANN, C.-D.; KESSLER, C.; DOBOS, G.; MICHALSEN, A.; CRAMER, H. Effects of different dietary approaches on inflammatory markers in patients with metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition, Los Angeles*, v. 32, n. 3, p. 338–348, mar. 2016.
- SUD, S. C.; TUCKER, H. A.; MEITES, J. Estrogen-progesterone requirements for udder development in ovariectomized heifers^{1, 2}. *Journal of Dairy Science*, v. 51, n. 2, p. 210–214, 1968.
- TANGVARASITTICHAJ, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, v. 6, n. 3, p. 456–480, abr. 2015.
- TASKINEN, M.-R. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice*. *Diabetologia*, v. 46, n. 6, p. 733–749, 2003.
- TUCKER, H. A. Hormones, Mammary Growth, and Lactation: A 41-Year Perspective. *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 4, p. 874–884, abr. 2000.
- TURNER, C. W.; YAMAMOTO, H.; RUPPERT JR., H. L. The experimental induction of growth of the cow's udder and the initiation of milk secretion^{1,2}. **Journal of Dairy Science**, v. 39, n. 12, p. 1717–1729, 1 dez. 1956.
- WADE GN, JONES JJ. Neuroendocrinology of nutritional infertility. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**; v.287;p.1277–96; 2004.
- WILTBANK, M. et al. Mudanças no manejo reprodutivo para compensar os efeitos do alto consumo de energia em vacas leiteiras em lactação. In: **NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS**, 10, 2006, Uberlândia. Anais... Uberlândia: CONAPEC jr, p. 45-57. 2006.
- YAO, L.; HERLEA-PANA, O.; HEUSER-BAKER, J.; CHEN, Y.; BARLIC-DICEN, J. Roles of the chemokine system in development of obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, article 181450, 2014.

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

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

ZHOU, Y. P., and GRILL V... Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. **Journal of Clinical. Endocrinolgy. Metab.** v.80, p.1584–1590, 1995.