

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

Produção embrionária, perfil endócrino, metabólico e molecular de vacas holandesas não-lactantes recebendo dieta à base de milho ou polpa cítrica

Camila Spies

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

**Piracicaba
2016**

**Camila Spies
Médica Veterinária**

**Produção embrionária, perfil endócrino, metabólico e molecular de vacas holandesas
não-lactantes recebendo dieta à base de milho ou polpa cítrica**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2016**

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

Spies, Camila

Produção embrionária, perfil endócrino, metabólico e molecular de vacas holandesas não-lactantes recebendo dieta à base de milho ou polpa cítrica / Camila Spies. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

81 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Insulina 2. Embrião 3. Progesterona 4. Catabolismo hepático I. Título

CDD 636.234
S7565p

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

AGRADECIMENTOS

À Deus, que além de ter me dado a vida, me deu saúde em abundância, uma família maravilhosa e outras pessoas especiais, além das ótimas oportunidades.

Aos meu pais: Ivo e Eli Spies por terem me apoiado durante o mestrado e em todas as minhas escolhas, mesmo que às vezes as vontades fossem contrárias. Obrigada por todo carinho e educação, por todo amor e todos os esforços que vocês despendem para nos ver bem e realizando nossos sonhos! Quero ajudar, cada vez mais, a realizar os de vocês! À minha irmã Ana Cláudia S. Soder por ajudar a “segurar a barra”, cuidar dos nossos pais com tanta dedicação e por me fazer virar dinda do pequeno e lindo Murilo! Ao meu namorado Steben Crestani por me mostrar que nem tudo é tão complicado quanto eu faço parecer, pelas broncas, pelo companheirismo e amizade, pela diversão e claro, pelo amor!

Ao professor Roberto Sartori, que com toda sua experiência ensinou muito sobre diversos assuntos técnicos e científicos e nos mostrou os caminhos para realizar pesquisa de qualidade com seriedade. Que bom que para o senhor isso não foi o suficiente: obrigada pela confiança e por nos acolher de forma a nos fazer sentir parte da sua família! Obrigada pelas oportunidades e por permitir que eu fizesse parte do seu grupo, da ESALQ, e por ter me “adotado” como mestranda!

Ao grande grupo do LRA: a experiência de conviver tanto tempo com vocês foi fantástica. Acredito que eu esteja encerrando essa etapa sendo uma pessoa melhor... E a contribuição de vocês certamente é grande nisso tudo! Só quem viveu aqui para entender o que “se passa” nesse grupo! Foi muito intenso, foi divertido, foi desafiador! É difícil explicar! Muito obrigada Pepopig (Pedro L. J. Monteiro Jr), Lolo (Louise Helen de Oliveira), Jeca (Jéssica Nora Drum), Xande (Alexandre B. Prata), Léo (Leonardo de França e Melo), Anibal (Anibal B. Nascimento) e Jadson (Jobson Cajueiro).

À Dra. Aurea Canavessi por todo aprendizado relacionado ao qPCR, DNA, RNA e afins! Obrigada por todo tempo que “gastou” com essas análises, me ensinando, explicando e auxiliando. Tenho certeza que a sua família é especial do jeito que é porque você a sustenta com sua força e sabedoria. Obrigada por permitir que os alunos do Roberto possam fazer parte dela!

À Dra Monique M. Guardieiro por ter dado forma a esse projeto e ter iniciado o experimento de campo.

Ao professor Milo Wiltbank pelos conselhos relacionados ao projeto e por todo o time de Madison/WI que me recebeu bem e deu ideias e conselhos para a finalização do estudo.

Ao professor Eduardo Delgado, por me fazer entender a “necessidade de entender” a integração existente por trás de todos os sistemas orgânicos.

Ao professor Luiz L. Coutinho do Lab. de Biotecnologia da ESALQ/USP por permitir a realização das análises de RT-qPCR e à profissional exemplar Marcela Paduan por toda ajuda e todos os conselhos relacionados ao qPCR, corrida em gel, diluição de primers, etc!

À professora Carla M. Bittar do Lab. de Metabolismo Animal pelo auxílio nas dosagens de glicose e pelos ensinamentos na disciplina de Bioquímica Animal.

Ao professor Flávio Portela Santos pela elaboração das dietas experimentais.

Aos estagiários que não mediram esforços para que tudo corresse bem com os animais, com o trato, com as amostras, com os embriões: Cássio Muller, Jéssica Zullato, Alan dos Anjos, Ueliton Viegas. Vocês são especiais! Obrigada pela ajuda e por toda convivência. Teria sido realmente complicado sem vocês!

À ESALQ/USP pela estrutura, e em especial aos professores do Departamento de Zootecnia por todos os ensinamentos e esforços para fazer desse programa de Pós-Graduação o melhor do Brasil na área.

Aos funcionários do Departamento, em especial ao Seu Laureano que tanto nos ajudou com o manejo dos animais. Aos mecânicos! Aos CPZistas pela amizade, ajuda e aprendizado. Aos meninos do QCF pela parceria e aprendizado!

Ao CNPq pela concessão da bolsa e à FAPESP (Proc. 2014/03580-0) pelo financiamento do projeto.

“A inspiração existe, mas **tem que te encontrar trabalhando.**”

Pablo Picasso

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Influência da nutrição na reprodução.....	17
2.2 Influência da dieta nos produtos da fermentação ruminal e na concentração sanguínea de metabólitos.....	19
2.3 Mecanismos de ação e liberação da insulina.....	22
2.4 Insulina e reprodução.....	23
2.5 Resistência à insulina.....	24
2.6 Metabolização de hormônios esteroides.....	26
3 OBJETIVOS E HIPÓTESES.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Animais e manejo nutricional.....	31
4.2 Superovulação e Ultrassonografia.....	33
4.3 Colheita e classificação dos embriões.....	36
4.4 Biópsia hepática.....	37
4.5 Teste de tolerância à glicose.....	37
4.6 Dosagens Hormonais.....	38
4.7 Expressão gênica (RT-qPCR).....	39
4.7.1 Extração de RNA.....	39
4.7.2 Síntese de cDNA.....	40
4.7.3 Seleção de primers e genes de referência.....	41
4.7.4 PCR quantitativo (RT-qPCR).....	42
4.8 Cálculos.....	42
4.9 Análise Estatística.....	42
5 RESULTADOS.....	45
6 DISCUSSÃO.....	57
7 CONCLUSÕES.....	65
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERÊNCIAS.....	69

RESUMO

Produção embrionária, perfil endócrino, metabólico e molecular de vacas holandesas não lactantes recebendo dieta à base de milho ou polpa cítrica

A nutrição é um dos principais fatores que afetam a eficiência reprodutiva por influenciar o crescimento, maturação e capacidade ovulatória do folículo bem como o perfil e estado metabólico do animal, gerando cenários que prejudicam ou corroboram o desenvolvimento e estabelecimento da prenhez. Diferentes fontes energéticas utilizadas na nutrição são capazes de alterar os padrões de fermentação ruminal e causar respostas endócrinas distintas. A partir disso, os objetivos desse estudo foram avaliar de que forma duas fontes energéticas da dieta influenciam a produção embrionária, a expressão gênica de enzimas hepáticas que metabolizam progesterona (P4) e a insulinemia. Em um delineamento em crossover, 22 vacas holandesas não lactantes e não gestantes foram distribuídas em dois grupos: um recebendo milho e outro polpa cítrica como fonte de energia da dieta. A quantidade de alimento fornecida foi de 1,3% do peso corporal em matéria seca por dia. O estudo foi composto por dois períodos de 71 dias de duração e em cada um deles foram realizadas duas superovulações (aos 35 e aos 70 dias) e uma biópsia hepática (aos 71 dias). Amostras sanguíneas foram colhidas imediatamente antes do fornecimento do alimento e 4 horas após, em dias pré-determinados, para dosagem de glicose, insulina e P4. Ao final do estudo as vacas passaram por teste de tolerância à glicose (TTG). Foi quantificada a expressão gênica de enzimas que metabolizam a P4 por RT-qPCR. A análise estatística foi realizada por meio de regressão logística pelo Proc MIXED do SAS 9.3. Os dados de expressão gênica foram avaliados por meio de delta CT. Imediatamente antes do fornecimento do alimento, a insulina circulante foi maior para o grupo milho ($P < 0,01$) e a P4 circulante foi maior para o grupo polpa cítrica ($P < 0,01$). Quatro horas após a alimentação, a P4 foi igual entre os tratamentos. A relação da P4 circulante na hora 4 e 0 foi maior para o grupo milho ($P < 0,01$). Tanto a glicose basal como o Homa-IR (*Homeostasis model assessment of insulin resistance*) foram maiores para o grupo milho. No TTG, o grupo milho apresentou maior pico de glicose no momento 5 minutos, maior taxa de decaimento da glicose ($P = 0,01$) e menor tempo de meia vida da glicose ($P = 0,05$). Não houve efeito de tratamento na resposta superestimulatória, superovulatória, produção de embriões e na expressão gênica das enzimas que metabolizam a P4, mas as superovulações realizadas aos 70 dias produziram embriões de qualidade inferior em relação às realizadas aos 35 dias, independente de tratamento. Conclui-se que, embora tenha sido possível alterar a insulina circulante através da dieta, a quantidade e qualidade de embriões produzidos não foram alteradas. O aumento pós-prandial da P4 circulante não foi relacionado a menor expressão gênica das enzimas hepáticas que metabolizam a P4.

Palavras-chave: Insulina; Embrião; Progesterona; Catabolismo hepático

ABSTRACT

Embryo production, endocrine, metabolic and molecular profiles of non-lactating Holstein cows fed diets based on corn or citrus pulp

Nutrition is one of the main factors affecting reproductive efficiency by influencing the growth, maturation and ovulatory capacity of the follicle and metabolic status of the animal, leading to scenarios that impair or corroborate the development and establishment of pregnancy. Different energy sources in the composition of the diet can alter ruminal fermentation patterns and cause different endocrine responses. The objectives of this study were to evaluate how two different energy sources in the diet can influence embryo production, gene expression of liver enzymes that metabolize progesterone (P4) and circulating insulin. In a crossover design, 22 non-lactating and non-pregnant Holstein cows were allocated into two groups: one receiving corn and other receiving citrus pulp as the energy supply of the diet. The amount of feed provided was 1.3% of body weight of dry matter per day. The study consisted of two 71-days periods and cows were superovulated twice on each period (at 35 and 70 days). Liver biopsy was performed after 71 days from the beginning of each replicate. Blood was sampled immediately before feeding and 4 hours later, at predetermined days, for measurement of glucose, insulin and P4. At the end of the study cows underwent a glucose tolerance test (GTT). Gene expression of liver enzymes that metabolize P4 was quantified by RT-qPCR. Statistical analysis was performed using logistic regression of Proc Mixed of SAS 9.3. Gene expression data were evaluated using delta CT. Immediately before feeding, the circulating insulin was greater for the corn group ($P < 0.01$) and circulating P4 was greater for the citrus pulp group ($P < 0.01$). Four hours after feeding, circulating P4 was similar. The relationship of circulating P4 between hour 4 and 0 was greater for the corn group ($P < 0.01$). Both basal circulating glucose and HOMA-IR (Homeostasis model assessment of insulin resistance) were greater for the corn group. The corn group had also greater glucose peak at the time 5 minutes of the GTT, greater glucose rate of decay ($P = 0.01$) and a shorter half-life of glucose ($P = 0.05$). There was no treatment effect on superstimulatory and superovulatory response, on embryo production and on gene expression of liver enzymes that metabolize P4. However, superovulations performed at 70 days produced lower embryo quality compared to those performed at 35 days, regardless of treatment. In conclusion, although it was possible to change circulating insulin by feeding different diets, the quantity and quality of embryos produced were not affected by the diets. The postprandial increase in circulating P4 was not associated with altered gene expression of hepatic enzymes that metabolize P4.

Keywords: Insulin; Embryo; Progesterone; Hepatic catabolism

1 INTRODUÇÃO

Em sistemas intensivos de produção a fertilidade está associada a diversos fatores como saúde do animal, ambiência, genética, manejo e nutrição (CUMMINS et al., 2012; GARNSWORTHY et al., 2009; RIBEIRO et al., 2016; SARTORI et al., 2002). Esses fatores atuam de forma integrada e geram diversos cenários no qual técnicos e pesquisadores estão inseridos de forma a tentar encontrar alternativas que se sobreponham aos diversos obstáculos, com o intuito de obter melhores índices, já que a rentabilidade da pecuária depende fortemente da eficiência reprodutiva (MEADOWS; RAJALA-SCHULTZ; FRAZER, 2005).

Um crescimento significativo no setor agropecuário, no último século, foi gerado a partir da introdução de biotecnologias reprodutivas inovadoras, como criopreservação de sêmen, inseminação artificial (IA), ultrassonografia, sincronização de cio ou de ovulação, fecundação *in vitro* (FIV) e transferência de embriões (TE). Isso possibilitou, de forma segura, que a genética fosse propagada por diferentes países (BLONDIN, 2015).

A tecnologia de TE tem sido amplamente usada como forma de introduzir animais de elevado mérito genético na propriedade (VISHWANATH, 2003). Além de auxiliar no aumento do rebanho leiteiro utilizando receptoras de corte, por exemplo, também serve como fonte de renda (BLONDIN, 2015), no caso dos detentores de animais geneticamente superiores. Além disso, também pode ser utilizada como estratégia de manejo para obter melhores taxas de concepção das vacas repetidoras de serviço (RODRIGUES et al., 2010).

A produção mundial de embriões bovinos, tanto *in vitro* como *in vivo*, vem crescendo ao longo dos anos. De acordo com o último boletim gerado pela International Embryo Technology Society (IETS; PERRY, 2015), o ano de 2013 bateu recorde com a produção de mais de um milhão de embriões viáveis no mundo. Desse total, 730 mil foram derivados da produção *in vivo*; um número 4,2% maior comparado ao ano anterior (2012). A América do Sul é responsável pela produção de 10% desse total e o Brasil ocupou o 4º lugar dentre os países que mais produziram embriões *in vivo*: foram mais de 50 mil produzidos no ano de 2013. O número de TEs produzidos *in vivo* no ano de 2013 também cresceu. Foram 575 mil transferências, sendo a América do Norte responsável por 50% e a América do Sul por 12% das transferências (PERRY, 2015).

Diferente da produção *in vivo*, a produção *in vitro* é dominada pela América do Sul, que gerou 73% de um total de 517 mil embriões produzidos por essa técnica no ano de 2013.

O Brasil tem uma contribuição significativa para esse elevado número: produziu mais de 366 mil embriões (PERRY, 2015).

Dentro do contexto apresentado, é possível perceber que o mercado de embriões produzidos *in vivo*, tanto mundial como brasileiro, tem espaço e potencial para crescer ainda mais, visto que mercado existe, de acordo com o expressivo número de embriões produzidos *in vitro*. Portanto, o aprimoramento das técnicas, o conhecimento das respostas biológicas advindas do animal e a interação desses fatores deve ganhar atenção dentre as pesquisas na tentativa de tornar mais eficiente a produção *in vivo* de embriões.

Muitos grupos tem se dedicado a estudar protocolos para maximizar o processo de superovulação (SOV), muito embora o fator animal continue sendo o principal problema no que diz respeito à qualidade e quantidade de embriões produzidos, pois a minoria das vacas produz a maioria dos embriões viáveis colhidos (RIVERA et al., 2011). Outros fatores envolvidos na variabilidade da resposta superovulatória e/ou qualidade embrionária são: estação do ano (SARTORI et al., 2002), momento do ciclo estral no início do protocolo de SOV (RIVERA et al., 2011), técnica de lavagem dos cornos uterinos (CASTRO NETO et al., 2005; SARTORI et al., 2003), raça (GIMENES et al., 2015), sêmen utilizado (SARTORI et al., 2004), estado nutricional e dieta (ADAMIÁK et al., 2005; BASTOS et al., 2009; GONG et al., 2002b; SARTORI et al., 2012; YAAKUB et al., 1999).

Diferentes níveis de ingestão de matéria seca (IMS) afetam consideravelmente a fisiologia das fêmeas bovinas, podendo refletir em alterações comportamentais, de ciclicidade e de fertilidade (MOLLO, 2007). A subnutrição compromete o desenvolvimento folicular (MURPHY et al., 1991; O'CALLAGHAN et al., 2000) e a resposta superovulatória (HARRISON; RANDEL et al., 1986). Já a alta IMS causa efeitos negativos nos embriões através de alterações principalmente endócrinas (SANTOS; CERRI; SARTORI, 2008).

Além do nível de alimentação, o tipo de alimento também pode influenciar a produção embrionária. Suplementação à base de cevada em comparação à suplementação à base de polpa cítrica e polpa de beterraba comprometeu a qualidade de embriões congeláveis e viáveis produzidos (YAAKUB et al., 1999), provavelmente devido à variação dos metabólitos e hormônios gerados pelas dietas.

Nesse contexto se insere a polpa cítrica e milho, fontes energéticas que possuem características diferentes em relação à composição de carboidratos. Em torno de 75% do milho é composto por amido, enquanto que a polpa cítrica seca e processada possui aproximadamente 27% de pectina (LANZAS et al., 2007). Essas duas fontes energéticas, milho e polpa cítrica, podem produzir diferentes perfis de AGVs no rúmen (BEN-

GHEDALIA et al., 1989) que acarretam diferentes concentrações circulantes de insulina (SMITH et al., 2006).

A alta IMS também tem como efeito o aumento do fluxo sanguíneo hepático (SANGSRITAVONG et al., 2002). A consequência disso é o aumento do catabolismo hepático da progesterona (P4), um hormônio esteroide ligado à reprodução que sofre, portanto, variações de concentração em função da alimentação (SANGSRITAVONG et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003). No entanto, a concentração desse hormônio está diretamente ligada às respostas de fertilidade da fêmea bovina (MONTEIRO et al., 2015). Por isso, é desejável que a P4 seja mantida em alta ou baixa concentração em momentos distintos do ciclo estral, para que sejam ovulados oócitos saudáveis e para que ocorra a manutenção da gestação (WILTBANK et al., 2012).

Alguns estudos sugerem haver uma menor metabolização de P4 em situações de alta insulina sanguínea (COOKE et al., 2012; LEMLEY et al., 2008, 2010; SMITH et al., 2006; VIEIRA et al., 2010). Como a concentração da insulina pode ser maior após a ingestão de alimento, parece contraditório poder haver um efeito protetor dela sobre a metabolização de hormônios, já que, como mencionado acima, a IMS aumenta o fluxo sanguíneo hepático e favorece a metabolização de hormônios esteroides. No entanto, ainda não foram descritos na literatura estudos que conseguiram, de forma fisiológica, aumentar a insulina circulante e obter, posterior e concomitantemente, o aumento da concentração de P4 e a diminuição da expressão de enzimas que a metabolizam.

A atuação da insulina vai além da influência na metabolização da P4. Esse hormônio tem uma função holística no organismo. Sua ação como promotora da entrada de glicose em células de que dela dependem é apenas uma dessas funções. Além de atuar no metabolismo de carboidratos, de ácidos graxos (AG) e de proteínas, a insulina interfere na secreção de metabólitos e de outros hormônios (NUSSEY; WHITEHEAD, 2001; REECE, 2006) e sua concentração no plasma está positivamente correlacionada com a ingestão de alimento e energia (BASSETT, 1974).

Distúrbios de metabolismo relacionados à insulina são muito descritos em humanos como, por exemplo, a Diabetes mellitus, caracterizada por problemas na secreção de insulina por parte do pâncreas (tipo 1) ou pela diminuição da resposta da insulina (tipo 2, também chamada de resistência à insulina; NUSSEY; WHITEHEAD, 2001).

Sabe-se que em vacas leiteiras a resistência à insulina em tecidos periféricos é uma adaptação homeorrética/fisiológica que acontece durante o período mais marcante de sua vida, o período de transição, no qual ela deixa de ser gestante e não lactante para se tornar

lactante e não gestante. Assim, a fêmea envia menos glicose para tecidos como o adiposo e muscular (que são insulino-dependentes) e direciona essa fonte de energia principalmente para a sua cria: em direção ao útero enquanto gestante e em direção à glândula mamária quando lactante (BAUMAN; CURRIE, 1980; BELL; BAUMAN, 1997).

Além do fator fisiológico relacionado à partição de nutrientes, também existe o patológico: a resistência à insulina é descrita como um problema metabólico, principalmente de vacas obesas (DE KOSTER et al., 2015). Mas as consequências da resistência à insulina associada ou não à obesidade na reprodução ainda não são bem claras.

Sendo assim, produção embrionária e metabolização de P4 são os principais temas que compõem esse estudo que visa: buscar melhores alternativas alimentares para vacas doadoras de embriões; entender a relação existente entre alimentação, insulina e a expressão de enzimas que metabolizam a P4 e entender de que forma as respostas reprodutivas são influenciadas pela dieta e pela insulina circulante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Influência da nutrição na reprodução

A viabilidade do organismo e de suas funções vitais depende da manutenção da homeostase, ou seja, da concentração intracelular relativamente constante dos metabólitos solúveis, e também da oferta contínua de energia e de substratos para processos oxidativos e sintéticos. O fluxo de matéria e energia no organismo é contínuo, mas varia em intensidade ao longo do tempo e entre os diferentes tecidos, dependendo, por exemplo, do nível de atividade ou da condição fisiológica do animal. Já a obtenção de substratos do meio ambiente ocorre de forma intermitente: somente após a ingestão dos alimentos. Desse modo, os animais desenvolveram a capacidade de adaptar o seu metabolismo, pelo menos até certos limites, para resolver o problema do excesso ou da escassez de substratos que ocorre durante a ingestão de alimento ou durante o jejum, respectivamente (KOZLOSKI, 2011).

Os nutrientes obtidos através da nutrição, bem como os metabólitos derivados, atuam em diferentes níveis do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, alterando a produção e liberação de hormônios, metabólitos e fatores de crescimento que atuam direta ou indiretamente no controle da função ovariana e da produção de embriões (SARTORI et al., 2012; SARTORI; GUARDIEIRO; SURJUS, 2013). Diferentes níveis de IMS (proporcionando ganho, perda ou manutenção de peso corporal), por exemplo, afetam consideravelmente a fisiologia do ciclo estral, alteram a concentração de hormônios circulantes e o desempenho reprodutivo (ADAMIAK et al., 2005; GONG et al., 2002b; MURPHY et al., 1991; SELK et al., 1988; SURJUS, 2013). Exemplos de vários estudos são citados a seguir, tanto em vacas de corte como em vacas leiteiras.

A ingestão insuficiente de energia pode resultar em uma performance reprodutiva insatisfatória: diminuição do número de folículos no ovário de ovelhas superovuladas (O'CALLAGHAN et al., 2000), menor tamanho de folículo ovulatório (MURPHY et al., 1991) e menor taxa de ovulação em novilhas (HARRISON; RANDEL et al., 1986), atraso na puberdade (DAY et al., 1986), menores taxas de concepção em vacas de corte (SELK et al., 1988) e em vacas leiteiras (CARVALHO et al., 2014). Além disso, a ingestão insuficiente de alimento faz com que fêmeas bovinas apresentem anestro prolongado no pós-parto (BUTLER; SMITH, 1989) ou entrem em anestro após perderem entre 22 e 24% do seu peso corporal inicial (DISKIN et al., 2003).

A alta IMS também altera as respostas ovarianas e fisiológicas: maior tamanho de folículo ovulatório foi reportado em vacas de corte não lactantes *Bos indicus* ingerindo 1,5 vs.

1,0 e 0,7% da manutenção (SURJUS, 2013). O mesmo foi observado em novilhas mestiças, que também tiveram maior taxa de crescimento do folículo (ADAMIAK et al., 2005; ARMSTRONG et al., 2001) e em novilhas zebuínas (MOLLO, 2007). Ovelhas recebendo dieta acima das necessidades de manutenção por 32 dias tiveram maior número de folículos nos ovários (O'CALLAGHAN et al., 2000) e a produção *in vitro* de blastocistos foi menor em doadoras não superestimuladas que receberam dieta contendo alta energia (ARMSTRONG et al., 2001). Em vacas zebuínas (MARTINS et al., 2006; SURJUS, 2013) e em novilhas taurinas (ARMSTRONG et al., 2001; GUTIERREZ et al., 1997) a população de folículos antrais foi positivamente correlacionada com a alta ingestão de alimento. No entanto, outros trabalhos não mostram efeitos positivos da alta ingestão na contagem de folículos (ADAMIAK et al., 2005; BASTOS et al., 2009). Novilhas zebuínas ingerindo quantidades superiores às necessidades de manutenção (1,7% vs. 0,7%) tiveram menor intervalo entre luteólise e ovulação e apresentaram estro menos intenso (MOLLO, 2007).

Novilhas de corte taurinas superestimuladas recebendo o dobro das necessidades de manutenção por um período de 21 dias tiveram maior concentração de insulina e maior número de folículos no primeiro dia da administração de FSH comparado ao grupo que recebeu dieta de manutenção (M). Cinco dias após a indução da ovulação, novilhas do grupo M tiveram maior quantidade de folículos grandes (não ovulados; GONG et al., 2002b). No início desse estudo as fêmeas possuíam escore de condição corporal (ECC) de 2,1 (ou seja: eram magras e ganharam peso).

Diferente do estudo citado acima, dieta acima da manutenção (1,7 vs. 0,7%) prejudicou a resposta superestimulatória e superovulatória de novilhas de corte zebuínas, além de proporcionar menor número de estruturas totais colhidas (MOLLO, 2007). Também foi relatada menor produção embrionária a partir de oócitos de vacas lactantes recebendo dieta altamente energética vs. dieta com níveis adequados de energia (LEIVA et al., 2015). Em um estudo envolvendo vacas de corte mestiças (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*) recebendo dieta de manutenção (M) ou alta ingestão não houve diferença no número de folículos recrutados e ovulados. No entanto, o grupo M produziu maior número de estruturas e de embriões viáveis (BASTOS et al., 2009). Esse estudo foi realizado com vacas de alto ECC que começaram a receber a dieta experimental sete dias antes do início do protocolo de superestimulação.

Em um estudo envolvendo superestimulação e dieta foi observado que além da quantidade de alimento, o tipo de alimento também tem influência sobre a produção embrionária. Novilhas de corte *Bos taurus* que receberam quantidade restrita de concentrado tiveram maior resposta superovulatória e produziram mais embriões viáveis do que novilhas

que receberam concentrado *ad libitum*. Quando o concentrado fornecido teve como base a polpa cítrica/polpa de beterraba, a produção de embriões viáveis também foi maior comparado ao grupo que recebeu concentrado à base de cevada. Para os autores esse efeito se deve ao fato de o tipo de concentrado poder alterar os padrões de pH e fermentação ruminal, produzindo, portanto, diferentes perfis de ácidos graxos voláteis (AGVs; YAAKUB et al., 1999). Os embriões de Grau de qualidade 1 e 2 oriundos do estudo de Yaakub et al. (1999) foram utilizados em um segundo experimento que mostrou que o tipo de dieta também causa variações moleculares e metabólicas nos mesmos (WRENZYCKI et al., 2000).

A partir dos dados supracitados, é possível perceber que o status energético do animal parece ser um dos fatores determinantes quando se fala em efeito da nutrição na eficiência reprodutiva e a insulina parece ser um importante mediador desse efeito, visto que a concentração desse hormônio é maior em fêmeas que tiveram maior ingestão de alimento (ADAMIAK et al., 2005; GONG et al., 2002b, SALES et al., 2015; SURJUS, 2013). O ECC e a ingestão de nutrientes estão positivamente correlacionados com o IGF1 (YELICH et al., 1996), um fator de crescimento que tem enorme papel na regulação da função ovariana (BEAM; BUTLER, 1997).

Evidências de que a insulina e o status energético podem afetar a reprodução foram mostradas em um estudo que utilizou novilhas mestiças de moderado e baixo ECC recebendo dois diferentes níveis de alimentação. Novilhas caracterizadas como hiperinsulinêmicas (66% dos animais pertencentes ao grupo de ECC moderado e alta ingestão por período longo) tiveram menor número de folículos, menos oócitos colhidos após a OPU (*ovum pick up*) e produziram menos blastocistos no cultivo *in vitro* (ADAMIAK et al., 2005). Aparentemente, o efeito negativo do fornecimento de dietas de alta energia e acima das necessidades de manutenção parece ocorrer principalmente em animais de ECC moderado a alto, e quando fornecida por longos períodos.

2.2 Influência da dieta nos produtos da fermentação ruminal e na concentração sanguínea de metabólitos

Em ruminantes os carboidratos contidos nos alimentos são convertidos através da fermentação microbiana a AGVs, que constituem a maior fonte de energia para essa espécie, sendo rápida e eficazmente utilizados na manutenção e crescimento (BERGMAN, 1990). Os tecidos que constituem os estômagos, ceco e intestino grosso utilizam preferencialmente AGVs como substratos energéticos. Já o intestino delgado utiliza principalmente glicose como substrato energético. Como o fluxo líquido de glicose através do sistema portal é

geralmente negativo ou insignificante (KOZLOSKI, 2011), a glicose sanguínea varia pouco em função da alimentação (DE JONG, 1982), sendo a concentração sanguínea resultante do balanço entre produção (gliconeogênese) por parte do fígado (90%) e rins (10%) e uso pelos tecidos que dela dependem, como o tecido nervoso, medula renal, eritrócitos, epitélio intestinal, tecidos embrionários e a glândula mamária lactante (BELL; BAUMAN, 1997; KOZLOSKI, 2011).

No rúmen todos os polissacarídeos são degradados extracelularmente até suas unidades fundamentais (monossacarídeos), que dentro das células bacterianas são metabolizados por uma rota comum até piruvato: o precursor de todos os AGVs. O piruvato pode ser metabolizado para produtos mais oxidados ou cetogênicos (como acetato e butirato) ou para outros mais reduzidos ou glicogênicos (como o propionato e lactato). O que define a proporção em que cada um dos AGVs e lactato será produzido é a espécie bacteriana existente no rúmen e a concentração de NADH e H₂. Esses, por sua vez, dependem da composição da dieta ingerida pelo animal (KOZLOSKI, 2011), que pode alterar a proporção relativa e a atividade metabólica dos microorganismos por providenciar novos ou diferentes substratos (SALYERS, 1979).

Milho e polpa cítrica são caracterizados como alimentos energéticos. No entanto, possuem características diferentes no que diz respeito à composição de carboidratos e fermentação ruminal. De acordo com o CNCPS (Cornell Net Carbohydrate and Protein System; FOX et al., 2004), os carboidratos contidos nos alimentos são divididos em frações, dentre as quais estão: CA4 (açúcares solúveis, cujo produto da fermentação é propionato e butirato); CB1 (amido, que gera propionato) e CB2 (fibra solúvel, que inclui a pectina, cujo produto da fermentação é o acetato). A polpa cítrica possui 27%, 1,2% e 34,4% dos seus carboidratos incluídos nas frações CA4, CB1 e CB2, respectivamente. Já o milho moído fino possui 1,5%, 75,0% e 0,8% dos seus carboidratos nas respectivas frações (LANZAS et al., 2007).

O amido é classificado como um carboidrato não fibroso e não estrutural (localizado no conteúdo celular). Já a pectina é um carboidrato estrutural que integra a lamela média das plantas (HALL; PELL; CHASE, 1998). Apesar disso, ela é classificada como um carboidrato não fibroso, por possuir alta e constante digestibilidade (BEN-GHEDALIA et al., 1989). Como resultado da fermentação do milho, o pH ruminal médio se mantém menor e ocorre maior produção de propionato e lactato. A polpa cítrica, no entanto, quando fermentada produz maior relação acetato:propionato, além de geralmente não produzir lactato. A polpa cítrica, na média, não causa grande depressão de pH no rúmen embora seja fermentada mais

rapidamente que o amido (BAMPIDIS; ROBINSON, 2006; BEN-GHEDALIA et al., 1989; HATFIELD; WEIMER, 1995; KOZLOSKI, 2011).

Os AGVs são absorvidos em sua maioria pelo rúmen e direcionados ao fígado através do sistema porta. O acetato é metabolizado em tecidos periféricos e apenas uma pequena proporção é utilizada pelo fígado e pela parede dos intestinos (BERGMAN, 1990). O acetato é a maior fonte de energia para o ruminante (PETHICK et al., 1981) e serve de substrato para oxidação em tecidos como rim, coração e principalmente músculo esquelético. No tecido adiposo e na glândula mamária o acetato é o principal substrato para a lipogênese (HANSON; BALLARD, 1967), isso porque seu carbono consegue ser muito mais rapidamente incorporado aos AG do que o carbono da glicose (BALLARD; HANSON; KRONFELD, 1969). Quanto ao propionato, uma pequena parcela é utilizada pelas células do epitélio intestinal (BERGMAN, 1990). A maior parte dele é metabolizada no fígado, onde serve de substrato para a gliconeogênese, sendo o principal precursor da glicose (BAIRD et al., 1980; DRACKLEY; OVERTON; DOUGLAS, 2001). O propionato atende entre 50-75% das necessidades de glicose do organismo. O restante fica por conta de aminoácidos, lactato e glicerol (BERGMAN, 1990).

A regulação da secreção de insulina em ruminantes é diferente dos não-ruminantes. Propionato, butirato, valerato, mas não acetato, administrados por via intravenosa ou infundidos no rúmen, são potentes estimuladores da secreção de insulina (HORINO et al., 1968; OH et al., 2015). A ação do propionato, mas não do acetato, de aumentar a insulina ficou evidente em um estudo de Smith et al. (2006) no qual ovelhas receberam via oral acetato de sódio ou propionato de sódio (Figura 1).

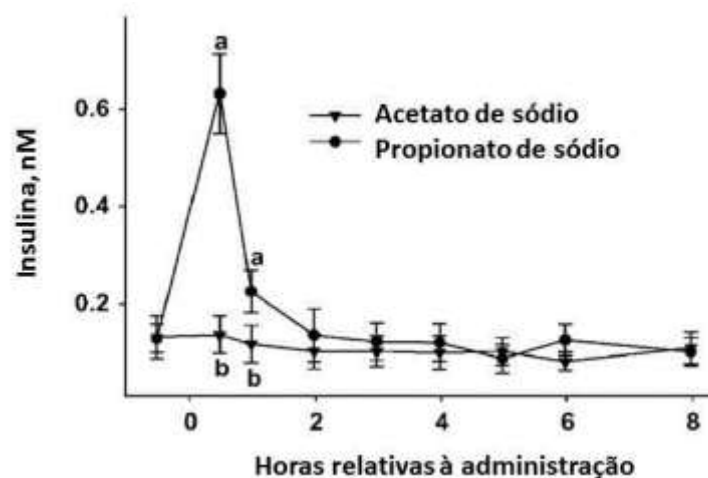


Figura 1 - Concentração sérica de insulina após administração de acetato ou propionato de sódio (em quantidades isoenergéticas) por via oral em ovelhas. Letras diferentes indicam diferença na concentração. Adaptado de Smith et al. (2006)

2.3 Mecanismos de liberação e ação da insulina

A insulina é um hormônio proteico produzido pelo pâncreas e liberado no sangue portal em resposta a aumentos de metabólitos como glicose (NUSSEY; WHITEHEAD, 2001), propionato, butirato (MASHEK et al., 2001), manose, sorbitol, N-acetilglucosamina, D-gliceraldeído, diidroxiacetona, inosina, alguns aminoácidos e determinados ácidos graxos. Drogas e estímulos neurais também podem desencadear a liberação da insulina (HEDESKOV, 1980), cuja inativação ocorre no fígado e rins (VALERA MORA et al., 2003).

Tanto a biossíntese como a liberação da insulina estão relacionadas com estímulos fornecidos por intermediários do metabolismo da glicose (HEDESKOV, 1980). A pré-pró-insulina contida no retículo endoplasmático rugoso das células- β das ilhotas de Langerhans do pâncreas é clivada passando a formar a pró-insulina, que é direcionada para o complexo de golgi onde são formados os pré-grânulos contendo a pró-insulina (STEINER, 1967). Ainda no complexo de golgi os pré-grânulos passam por maturação, processo em que a cadeia “C” de peptídeos é removida formando grânulos de insulina (STEINER, 1967). Quando a concentração de glicose aumenta o metabolismo das células- β é acelerado, levando a aumentos na concentração de ATP no citossol. Como resultado, a atividade dos canais de potássio diminui, causando a despolarização da membrana e a abertura dos canais de cálcio. O influxo de cálcio culmina com a exocitose dos grânulos contendo insulina (GRODSKY, BENETT 1966; HEDESKOV, 1980; HENQUIN et al., 2009; LACY, 1961).

A insulina regula o metabolismo de forma a manter o nível de glicose constante. Dependendo do nível de energia ingerido, a manutenção da glicemia pode envolver mobilização de reservas corporais para haver substrato para a síntese de glicose ou estocagem do excesso de nutrientes. A insulina, nesse contexto, é o principal hormônio regulador do metabolismo do animal (BROCKMAN; LAARVELD, 1986), sendo o glucagon, hormônio do crescimento (GH), cortisol e catecolaminas alguns dos principais contribuintes para a regulação da homeostase da glicose (BROCKMAN; LAARVELD, 1985).

No tecido adiposo e muscular a insulina possui um efeito anabólico. Ela suprime a lipólise e estimula a lipogênese nos adipócitos, e estimula a síntese e inibe a degradação proteica no músculo, além de estimular a glicogênese. No fígado ela determina a supressão da glicogenólise (BROCKMAN; LAARVELD, 1986), diminui a cetogênese independente da concentração de AG livres e estimula a glicogênese (BROCKMAN; LAARVELD, 1985). Em órgãos insulino dependentes (como tecido muscular e adiposo) a insulina tem como função intermediar a entrada de glicose nas células: ao se ligar no seu receptor desencadeia uma série

de fosforilações que acabam por gerar a translocação de receptores GLUT (de glicose) para a membrana das células (NUSSEY; WHITEHEAD, 2001).

2.4 Insulina e reprodução

Na reprodução o efeito da insulina também é amplamente estudado. *In vitro*, células da granulosa de folículos bovinos cultivadas com insulina aumentaram em número e produziram mais P4. Na presença de FSH a insulina também aumentou a produção de estradiol (E2) pelas células da granulosa (SPICER; ALPIZAR; ECHTERNKAMP, 1993). A insulina também está envolvida com a proliferação celular e com a concentração de IGF1 no folículo (SPICER; ECHTERNKAMP, 1995).

Administração de insulina em vacas superestimuladas e posteriormente ovariectomizadas não aumentou o número de folículos, mas aumentou o tamanho deles e a produção de IGF1 e de E2 (SIMPSON et al., 1994). A administração de insulina antes da administração de FSH em ovelhas superestimuladas gerou benefícios na esteroidogênese e na foliculogênese, mas não alterou a produção de embriões (SELVARAJU et al., 2003). Em marrãs a administração de insulina aumentou a concentração de IGF1 no fluido folicular de folículos médios (4-6 mm), aumentou o número de folículos pequenos (≤ 3 mm) e reduziu o número de folículos atrésicos independente do ECC, sem alterar a concentração de outros hormônios (MATAMOROS; COX; MOORE, 1991). A taxa de ovulação foi aumentada em porcas através de *flushing* (aumento abrupto na quantidade de MS fornecida por um curto período; FLOWERS et al., 1989) e também em novilhas de corte suplementadas com insulina, recebendo 75% das necessidades de manutenção (HARRISON; RANDEL et al., 1986).

Novilhas que receberam somatotropina bovina (bST) em diferentes doses somente apresentaram maior número de folículos pequenos (< 5 mm) quando a dose fornecida foi capaz de aumentar as concentrações de insulina e IGF1. Nessas doses, as concentrações de gonadotrofinas não foram alteradas, mostrando um efeito direto da insulina e IGF1 nos folículos (GONG et al., 1997). Em outro estudo, altas concentrações de insulina em função da dieta foram negativamente associadas à resposta superovulatória, produção de embriões viáveis e taxa de concepção desses embriões (SURJUS, 2013).

O aumento da insulina circulante promovido pela dieta tem o potencial de acelerar o início da ciclicidade após o parto: Gong et al. (2002a) observaram que o fornecimento de dieta que proporcionava maiores concentrações de insulina nos primeiros 50 dias pós-parto antecipou a primeira ovulação. No entanto, alguns autores relatam que a manutenção de vacas e novilhas em uma dieta hiperinsulinêmica pode ter efeitos deletérios sobre as taxas de

sobrevivência embrionária (ADAMIAK et al., 2005; BASTOS et al., 2009). Garnsworthy et al. (2009) sugeriram então um manejo nutricional estratégico: o fornecimento de uma dieta insulinogênica (rica em amido) do parto até o início do período reprodutivo para melhorar o desenvolvimento folicular e a retomada da ciclicidade; e outra dieta (gerando baixa insulina) a partir desse período, baseando-se na ideia de que a baixa insulina circulante beneficiaria o desenvolvimento e competência oocitária. Essa estratégia (dieta gerando alta insulina durante o período voluntário de espera seguido de dieta gerando baixa insulina após esse período) proporcionou maior número de folículos até 60 dias pós-parto e maior taxa de concepção, embora o número de animais utilizados nesse estudo tenha sido pequeno ($n = 15/\text{grupo}$). Os autores sugerem que a exposição dos folículos a alta insulina durante o desenvolvimento inicial pode ser benéfica.

2.5 Resistência à insulina

A Diabetes mellitus é definida, de forma resumida, como um aumento na concentração de glicose devido à redução da secreção de insulina por parte do pâncreas (Diabetes mellitus do tipo I) ou devido à resistência à insulina (Diabetes mellitus do tipo II; NUSSEY; WHITEHEAD, 2001).

A Diabetes mellitus do tipo II é caracterizada, mais comumente, como uma combinação entre resistência a insulina (inicial) e uma relativa deficiência na secreção de insulina (secundária): a resistência à insulina ocorre inicialmente, mas é compensada com maior secreção de insulina por parte do pâncreas, dando origem a uma hiperinsulinemia compensatória. O pâncreas é então levado à exaustão e pode falhar ao tentar compensar a resistência à insulina. Com isso, as concentrações de glicose aumentam, estabelecendo a Diabetes mellitus do tipo II (DEFRONZO, 2004).

A resistência à insulina, a nível molecular, ocorre quando há problemas na sinalização pós-receptor, ou seja, no espaço intracelular (na cascata de sinalização promovida pela insulina dentro da célula) dos tecidos muscular, adiposo e hepático (FRÖJDÖ; VIDAL; PIROLA, 2009). A consequência disso é uma diminuição na responsividade e/ou na sensibilidade à insulina (MUNIYAPPA et al., 2008). Então, metabolicamente, a resistência à insulina é definida como um estado em que uma concentração normal de insulina induz uma resposta biológica diminuída em tecidos insulino dependentes (KAHN, 1978).

A resistência à insulina pode ocorrer de forma patológica ou fisiológica na vaca leiteira (DE KOSTER; OPSOMER, 2013). Como exemplo da forma fisiológica (também chamada de adaptação homeorrética) pode ser citado o período de transição, no qual a

resistência à insulina faz com que a glicose seja usada, primordialmente, para manutenção das funções vitais, para o crescimento fetal no pré-parto e para produção de leite no pós-parto (BELL; BAUMAN, 1997), já que tanto a placenta como a glândula mamária não dependem de insulina para obter glicose (HOCQUETTE; ABE, 2000).

Em humanos aproximadamente 50% das mulheres acometidas pela síndrome do ovário policístico (SOP) apresentam resistência à insulina (DUNAIF et al., 1989). Anormalidades no metabolismo de lipídios também têm sido descritas em mulheres acometidas por essa síndrome, como elevada concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) e colesterol (WILD et al., 1985). Essa relação entre resistência à insulina e doença cística não se mostrou verdadeira em vacas leiteiras (OPSOMER et al., 1999). No entanto, assim como em humanos, o metabolismo de lipídeos também tem influência na resistência à insulina em bovinos: vacas desafiadas a mobilizar reservas corporais (a partir de jejum de 48 horas) apresentaram maior concentração de AGNEs e se mostraram mais resistentes à insulina comparadas às vacas que receberam agente antilipolítico (ácido nicotínico) durante o mesmo período de jejum, mostrando que há relação de causa e efeito entre AGNEs e resistência à insulina em vacas holandesas (PIRES; PESCARA; GRUMMER, 2007). A ação dos AGNEs parece ocorrer na inibição da cascata de fosforilação que seria desencadeada pela insulina após ligação com seu receptor (GAO et al., 2004).

A obesidade em vacas leiteiras ocorre principalmente com vacas não lactantes e pode afetar negativamente a lactação seguinte pelo fato de ser um fator de risco para o desenvolvimento de desordens metabólicas, doenças infecciosas e problemas reprodutivos (ROCHE et al., 2013), provavelmente devido à extensiva mobilização de AG em vacas obesas no pós-parto (RICO et al., 2015; RUKKWAMSUK et al., 1999) em função da diminuição da ação antilipolítica da insulina (DE KOSTER; OPSOMER, 2013). Além disso, vacas obesas são mais resistentes à insulina comparadas a vacas magras (DE KOSTER et al., 2015; RICO et al., 2015) devido à diminuição da sensibilidade e responsividade da insulina ao metabolismo de glicose (DE KOSTER et al., 2015).

A resposta da insulina ao metabolismo de glicose em vacas leiteiras secas está negativamente associada com o acúmulo excessivo de tecido adiposo enquanto que a resposta da insulina ao metabolismo de AG não é alterada (DE KOSTER et al., 2015). Isso ocorre porque a sensibilidade à insulina é menor no metabolismo da glicose comparado ao metabolismo de AG dentro de um mesmo indivíduo; ou seja, o efeito antilipolítico da insulina ocorre a uma concentração menor de insulina comparado ao efeito estimulatório da insulina no transporte de glicose (KAHN; FLIER, 2000).

Embora vacas holandesas se tornem resistentes à insulina com o avançar da lactação (150 vs. 50 e 100 DEL), a produção de oócitos (qualidade e quantidade) não foi alterada (OLIVEIRA et al., 2016). Já novilhas com alto ECC recebendo dieta de alta energia, e que se tornaram hiperinsulinêmicas, tiveram a produção embrionária *in vitro* prejudicada (ADAMIAK et al., 2005). Em vacas *Bos indicus* da raça Gir a alta ingestão de alimento por 60 dias não influenciou o número ou a qualidade dos oócitos colhidos, mas prejudicou a qualidade de embriões produzidos *in vitro* (SALES et al., 2015). Portanto, sabe-se que, de fato, vacas se tornam resistentes à insulina. Mas não está claro de que forma a resistência à insulina, ligada ou não à obesidade e à nutrição, afeta a fisiologia da reprodução.

2.6 Metabolização de hormônios esteroides

O efeito da nutrição na reprodução vai além da influência no tamanho de estruturas ovarianas, número de folículos, qualidade embrionária, produção de AGVs ou metabólitos sanguíneos. A ingestão de alimento também causa aumento do fluxo sanguíneo hepático e, por conseguinte, aumenta o catabolismo hepático de hormônios esteroides como a P4 e o E2. Em vacas lactantes o catabolismo desses hormônios é mais pronunciado do que em vacas secas devido à maior ingestão de alimento e, conseqüentemente, maior fluxo sanguíneo hepático (SANGSRITAVONG et al., 2002).

A alta produção de leite relacionada à alta ingestão de alimento e genética (HARRISON et al., 1990) gera mudanças na fisiologia reprodutiva: expressão e duração de cio reduzida (HARRISON et al., 1990; LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004), maior tamanho de folículo ovulatório (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004), maior ocorrência de dupla ovulação (LOPEZ et al., 2005) e maior perda de prenhez (MANN et al., 1998; SANTOS et al., 2004). No entanto, nem sempre é desejada uma alta concentração de P4 circulante. A literatura descreve que a concentração desse hormônio é importante, basicamente, em três momentos distintos: necessita ser alta durante o desenvolvimento do futuro folículo ovulatório (MONTEIRO et al., 2015) ou dos futuros folículos ovulatórios no caso de superestimulação (RIVERA et al., 2011); baixa nos momentos próximos à inseminação (BISINOTTO et al., 2013; MONTEIRO et al., 2015) e alta após a ovulação (CLEMENTE et al., 2009; WILTBANK et al., 2012) para que se obtenha melhores respostas de fertilidade.

A concentração de P4 sanguínea é determinada pelo balanço entre a produção (primariamente do CL; NISWENDER et al., 1994) e o catabolismo (predominantemente hepático; MURRAY 1991; WILTBANK et al., 2012). O catabolismo da P4 nos hepatócitos

envolve duas fases: na primeira há adição de grupos hidroxil ao núcleo esteroide (pelas enzimas CYP3A, CYP2C e AKR1C) formando hidroxiprogesterona, enquanto que na fase II há a conjugação desses compostos com ácido glucurônico (envolvendo as enzimas UGT1A e UGT1B), formando hidroxiprogesterona-glucoronideo (BIDSTRUP et al., 2003; BOWALGAHA et al., 2007; LEMLEY; WILSON, 2010; MURRAY 1991; PENNING et al., 2000). O envolvimento das enzimas AKR e CYP no catabolismo da P4 em vacas foi confirmado em um estudo *in vitro*. Hepatócitos de seis vacas holandesas lactantes foram incubados com inibidores das enzimas CYP e AKR e em seguida desafiados com P4. O Curcumin (inibidor das enzimas CYP2C, CYP3A e AKR1C) inibiu 77% da inativação da P4 (lembrando que a ação inibitória sobre as enzimas não é de 100%; LEMLEY; WILSON, 2010).

Embora a inativação da P4 possa ser aumentada pelo efeito da ingestão de alimento (SANGSRITAVONG et al., 2002), há uma linha de pesquisa que defende o aumento da concentração de P4 ou diminuição da taxa de decaimento em função da ação da insulina de aliviar o catabolismo hepático. Parece um paradigma, já que a concentração de insulina é positivamente relacionada com o consumo de alimento em bovinos (BOSSIS et al., 2000). No entanto, seria algo desejável frente à importância da P4 e seu intenso catabolismo em animais com alta IMS.

Estudos *in vitro* confirmaram a ação protetora da insulina: em hepatócitos cultivados com insulina houve uma diminuição dose dependente no catabolismo de P4. Além disso, independente da concentração de insulina no cultivo, a taxa de decaimento da P4 foi menor comparado ao grupo controle (LEMLEY et al., 2009; SMITH et al., 2006). Também foi dose dependente a diminuição da atividade das enzimas CYP2C e 3A em hepatócitos cultivados com insulina (LEMLEY et al., 2009).

In vivo, vários trabalhos foram realizados com o intuito de aumentar a insulina sanguínea e em seguida avaliar o efeito na concentração circulante de P4. Moriel et al. (2008), suplementando vacas leiteiras mestiças não lactantes com diferentes fontes e formas de processamento de carboidratos, não observaram efeito de tratamento na concentração de P4 circulante, embora apenas a forma de processamento tenha alterado a concentração de insulina circulante (MORIEL et al., 2008).

De fato, administração intravenosa de insulina (1 µg/kg a cada 45 minutos, totalizando sete aplicações) juntamente com glicose aliviou o catabolismo da P4 em novilhas de corte *Bos taurus* (COOKE et al., 2012). Em ovelhas a administração via oral de propionato de sódio em comparação ao acetato de sódio (dose única, isoenergética, gerando concentrações

suprafisiológicas de AGVs no sistema porta-hepático) aumentou a concentração de insulina e de P4 circulante (entre 30 minutos e 1 hora e entre 3 e 4 horas após a administração, respectivamente; SMITH et al., 2006). Vacas leiteiras mestiças recebendo dieta com balanço positivo de nutrientes também apresentaram maior concentração de P4 após infusão de glicose (VIEIRA et al., 2010). Esses estudos envolveram aumentos agudos e transitórios na insulina e não apresentaram dados relativos às enzimas que metabolizam a P4.

O resultado de expressão gênica das enzimas que catabolizam P4 em resposta a aumentos de insulina é variável. Os estudos se diferenciam em vários quesitos: categoria e espécie animal, tempo de estímulo e tipo de estímulo de insulina, fonte de P4, momento da biópsia hepática, dentre outros. O aumento agudo e transitório de insulina através da infusão de glicose reduziu a expressão das enzimas CYP2C19 e CYP3A4 em vacas leiteiras mestiças não lactantes. No entanto, a P4 circulante não sofreu alteração (VIEIRA et al., 2013). Vacas holandesas com 10 DEL mantidas com clamp de insulina e glicose por 4 dias tiveram uma diminuição na expressão das enzimas CYP2C e CYP3A. No entanto, a P4 circulante não foi avaliada (LEMLEY et al., 2008). Vacas holandesas com 80 DEL recebendo dietas isoenergéticas e isoproteicas (variando na composição: alto concentrado vs. alta fibra) por 12 dias, sendo a colheita de tecido hepático realizada 3,6 horas após a ingestão de alimento, não tiveram alteração na expressão gênica das enzimas nem na taxa de decaimento e meia vida da P4 (LEMLEY et al., 2010). O fornecimento crônico de propilenoglicol (10 dias pré-parto até 25 dias pós-parto) foi associado a uma diminuição de 63% na expressão de CYP3A, mas os dados de P4 circulante não foram apresentados (LEMLEY et al., 2008). Ovelhas mestiças pré-púberes recebendo dieta *ad libitum* (3,8% do peso corporal em MS) apresentaram maior concentração de insulina circulante e menor concentração circulante de P4 comparadas às ovelhas que receberam dieta restrita (2% do peso corporal em MS). No entanto, não houve efeito de tratamento na expressão gênica das enzimas CYP2C, CYP3A, AKR1C e AKR1D (MATTOS, 2012).

Sendo assim, trabalhos utilizando dietas que consigam, em condições fisiológicas, aumentar a insulina, alterar a expressão de enzimas e aumentar a concentração de P4, aparentemente não foram ainda realizados ou publicados.

3 OBJETIVOS E HIPÓTESES

Objetivos gerais

Avaliar a produção embrionária, a resposta ovariana (superestimulação e SOV), a expressão gênica de enzimas que metabolizam a P4, o metabolismo relacionado à insulina e glicose e o perfil metabólico de vacas alimentadas com diferentes dietas buscando respostas que visam explicar a interação da nutrição com a reprodução.

Objetivos específicos

Avaliar o efeito de dieta contendo mais amido (à base de milho) comparada à dieta contendo mais pectina (à base de polpa cítrica) sobre:

- a) as concentrações circulantes de P4 antes do fornecimento do alimento e 4 horas após e as concentrações pré-prandiais circulantes de insulina;
- b) a resposta superestimulatória e superovulatória e a produção de embriões;
- c) a dinâmica folicular;
- d) a expressão gênica das enzimas que metabolizam a P4:
 - CYP2C19: Citocromo P450, família 2, Subfamília C, polipeptídeo 19;
 - CYP3A4: Citocromo P450, família 3, Subfamília A, polipeptídeo 4;
 - AKR1C4: Aldo-keto redutase, família 1, membro C4;
 - AKR1D1: Aldo-keto redutase, família 1, membro D1.
- e) as respostas ao teste de tolerância à glicose (TTG).

Hipóteses

1. A dieta à base de polpa cítrica proporcionaria uma diminuição nas concentrações sanguíneas de insulina e conseqüentemente, a expressão gênica de enzimas que metabolizam a P4 seria maior nessas vacas, levando a uma menor concentração de P4 no sangue.
2. A maior concentração de insulina em vacas recebendo dieta à base de milho prejudicaria a resposta superovulatória e a produção embrionária.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e manejo nutricional

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Uso de Animais em Pesquisa da ESALQ/USP (CEUA/ESALQ-USP; Protocolo nº 2014/20).

O experimento foi conduzido no período de junho a novembro de 2014, no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, Brasil.

Vinte e duas vacas da raça Holandês Preto e Branco (HPB), não gestantes e não lactantes, foram distribuídas de acordo com peso, ECC (escala de 1 [emaciada] a 5 [obesa]; FERGUSON; GALLIGAN; THOMSEN, 1994) e população folicular em dois grupos para receberem duas dietas experimentais.

As avaliações ginecológicas e ultrassonográficas foram realizadas anteriormente ao início do experimento para contagem do número de folículos antrais e avaliação da viabilidade do trato reprodutivo utilizando aparelho de ultrassom (Transdutor linear transretal, 7,5 MHz, Mindray DP 2200 vet, Mindray, China).

As vacas foram mantidas em sistema de semi-confinamento, com cocho individual e canzil (tábuas de madeira limitavam o espaço de cada vaca no cocho, Figura 2), em área dividida em dois piquetes, com livre acesso à água e com alimentação controlada.

O delineamento do estudo foi em reversão, do tipo crossover, tendo cada um dos dois períodos duração de 70 dias com 14 dias de *washout* entre um período e outro. As dietas foram formuladas com base nas exigências de manutenção do NRC (2001), eram isocalóricas e isoenergéticas, variando apenas na composição. A transição de uma dieta para outra (*washout*) foi realizada adicionando-se proporções cada vez maiores da dieta seguinte (relação entre uma e outra dieta expressa em percentagem): 70:30 (por 3 dias), 50:50 (por 3 dias), 20:80 (por 3 dias) e 0:100 (por 5 dias).

A dieta experimental foi fornecida por um período de adaptação de 14 dias. Em seguida, as vacas foram designadas a dois grupos experimentais: 1) dieta mais insulínogênica, tendo milho como fonte de propionato e 2) dieta menos insulínogênica, tendo polpa cítrica como fonte de acetato (Tabela 1). Ao concentrado era misturado bagaço de cana-de-açúcar (tratado com pressão e vapor, como fonte de volumoso) em quantidades relativas ao teor de matéria seca (MS) do bagaço.

A quantidade de ração era dividida em duas porções e fornecida às 8:00 horas e às 17:00 horas. A pesagem dos animais era realizada a cada 2 semanas, após jejum de 12 horas. A quantidade de ração fornecida às vacas era pesada de forma individual diariamente, bem como as sobras de coxo. A quantidade de alimento para cada unidade experimental era ajustada quinzenalmente, de acordo com o teor de MS do bagaço de cana-de-açúcar. Cada vaca ingeriu, em média, 8,9 kg de MS/dia da ração, o que representou 1,3% do peso corporal em MS, sendo que as vacas pesaram, em média, 682 kg. A porção em MS da dieta fornecida que correspondia ao bagaço de cana-de-açúcar era de 28%. Não houve efeito de tratamento no consumo médio diário.

O núcleo mineral utilizado na ração total era composto pelos seguintes Macronutrientes (g/kg): Cálcio 180, Fósforo 40, Magnésio 30, Potássio 70, Sódio 120, Enxofre 50. Micronutrientes (mg/kg): Cobalto 30, Cobre 650, Iodo 40, Manganês 1000, Selênio 15, Zinco 2000. Vitaminas (UI/kg): A – 6.000.000, D – 140.000, E – 8.000.



Figura 2 - Local onde o experimento foi realizado. O coxo foi subdividido com tábuas de madeira para que cada animal ingerisse apenas o alimento que lhe era destinado

Tabela 1 – Composição nutricional e análise bromatológica das dietas

Ingredientes	Concentrado Milho (MO^d, g/kg)	Concentrado Polpa Cítrica (MO, g/kg)
Milho moído	874	-
Polpa Cítrica	-	840
Farelo de Soja	80	116
Ureia	19	18
Núcleo Mineral	27	26
Análise bromatológica	Ração Milho (% MS)	Ração Polpa Cítrica (% MS)
Matéria Seca ^c	70,0	76,5
Proteína Bruta	14,1	13,5
Fibra Bruta	20,6	21,8
Extrato Etéreo	3,1	1,8
Matéria Mineral	7,5	8,8
Nutrientes Digestíveis Totais ^a	67,0	64,9
Energia digestível ^b , Mcal/kg	2,95	2,86

^a Determinado pelo Método de Kearn

^b Calculado a partir do método descrito pelo NRC (2001): Energia digestível (Mcal/kg) = 0,04409*NDT(%)

^c 28% da MS da ração fornecida aos animais correspondia ao bagaço de cana-de-açúcar

^d Matéria orgânica

4.2 Superovulação e ultrassonografia

Em cada um dos dois períodos experimentais as vacas foram superovuladas duas vezes, com intervalo de aproximadamente 35 dias, totalizando quatro SOVs (Figura 3), conforme o protocolo que segue (Figura 4). D0: 2 mg de benzoato de E2 (Ric-BE, Tecnopec, São Paulo, Brasil), implante intravaginal de P4 (DIB, Zoetis Saúde Animal, Buenos Aires, Argentina; vacas sem CL receberam dois implantes); D4 a D7: doses decrescentes de FSH (NIH-FSH-P1, Folltropin-V, Bioniche Animal Health, Belleville, Canadá) na concentração de 15 mg/mL, duas vezes ao dia, administradas com intervalo de 12 horas, sendo o volume de cada aplicação de: 3,5 mL no D4, 3,0 mL no D5, 2,5 mL no D6 e 2 mL no D7; D6: duas doses de 500 µg de PGF2α (Sincrocio, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil) cada, com intervalo de 12 horas; D7: retirada do(s) implante(s); D8: 200 µg GnRH (Cystorelin, Merial, Hospira, KA, EUA) pela manhã e inseminação artificial (IA) à tarde; D9: IA pela manhã.

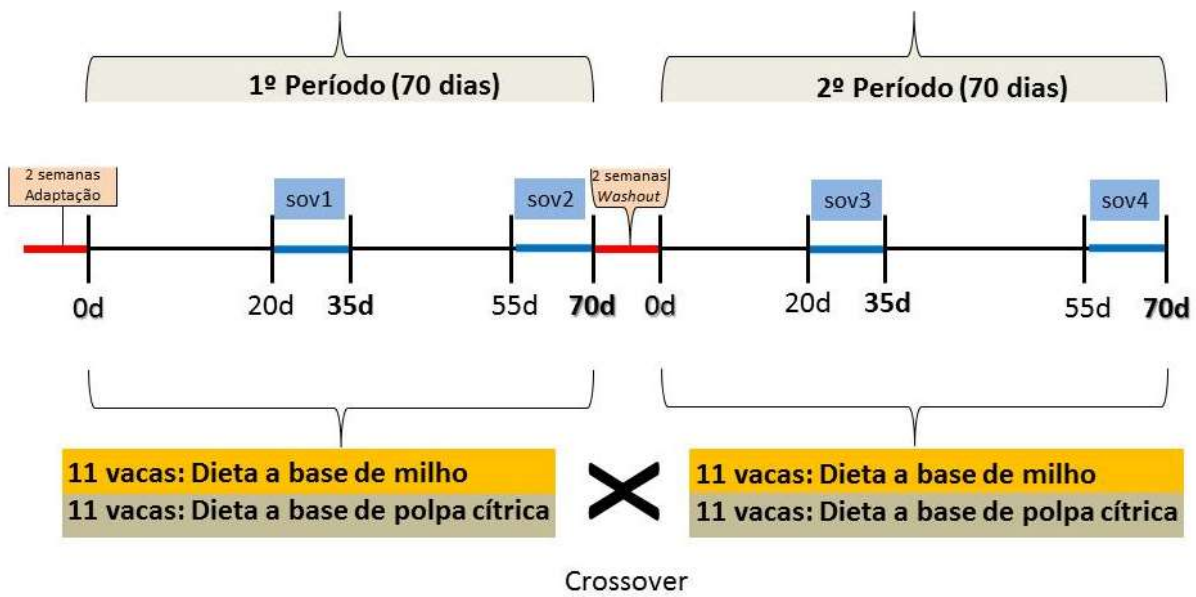


Figura 3 - Delineamento em reversão do tipo crossover. O experimento foi dividido em dois períodos de 70 dias cada. Em cada período foram realizadas duas superovulações. O tempo de adaptação da dieta experimental foi de duas semanas antes do início do experimento e duas semanas para a mudança de dieta entre um período e outro (*washout*). PC: Peso corporal; d: dias relativos ao início do experimento em cada um dos períodos; Sov: superovulação

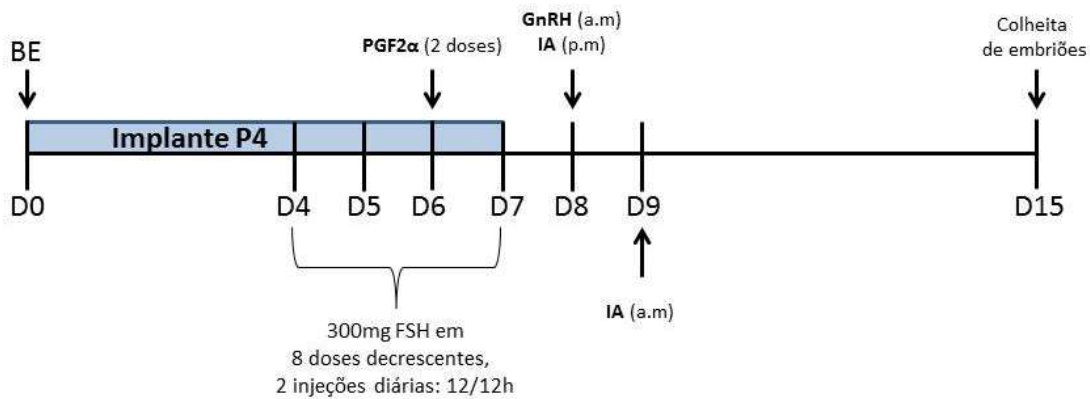


Figura 4 - Protocolo de superovulação. D: dia do protocolo; BE: Benzoato de Estradiol; P4: Progesterona; PGF2α: Prostaglandina F2α; GnRH: Gonadorelina; IA: Inseminação Artificial; a.m.: período matutino; p.m.: período vespertino; FSH: Hormônio folículo estimulante

Para a IA, doses de sêmen convencional congelado de três touros da raça HPB (cada touro de uma única partida) foram distribuídas entre os tratamentos, sendo que cada vaca foi acasalada com o mesmo touro nos quatro protocolos de SOV.

Exames ultrassonográficos foram realizados em cinco momentos durante o protocolo de SOV: D0 do protocolo para contagem e medição de corpos lúteos (CLs); D4 (dia da primeira aplicação de FSH) para contagem de folículos entre 2 e 5 mm de diâmetro; D7 (dia da aplicação do último FSH) para contagem de folículos ≥ 8 mm (avaliação da resposta superestimulatória); D10 (segundo dia após a indução da ovulação): contagem de folículos ≥ 8 mm (resposta superovulatória); D15 (dia da colheita de embriões): contagem de CLs.

Antes da primeira SOV de cada período as vacas foram sincronizadas para aumentar a probabilidade de haver CL no início do protocolo de SOV. O protocolo utilizado para a sincronização da ovulação foi (dias relativos ao início do protocolo de SOV; Figura 5): D-20: 200 μg GnRH (Cystorelin, Merial, Hospira, KA, EUA) e implante de P4 (DIB, Zoetis Saúde Animal, Buenos Aires, Argentina); D-13 e D-12: 500 μg PGF2 α (Sincrocio, Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil). A partir da segunda administração de PGF2 α foi realizada diariamente avaliação da dinâmica folicular com mensuração de estruturas ovarianas e observação de estro com o auxílio de dispositivo (EstroTECT, IVP do Brasil) até a ovulação. No D0 foi iniciado o protocolo de superestimulação. Antes da segunda e quarta superestimulações as vacas foram observadas em estro após a lise (em decorrência de duas doses de PGF2 α) dos CLs oriundos da SOV anterior. O ciclo subsequente foi acompanhado com dinâmica folicular e observação de estro diária (Figura 5). Vacas que não ovularam naturalmente antes da SOV e possuíam folículo ovulatório foram induzidas a ovular com 200 μg de GnRH (Cystorelin, Merial, Hospira, KA, EUA) e não entraram na análise estatística de tamanho de folículo ovulado. Vacas que não ovularam ao GnRH tiveram os folículos ≥ 20 mm aspirados e receberam dois implantes no início do protocolo de SOV, da mesma forma que receberam dois implantes as vacas que não possuíam folículo ovulatório na pré-sincronização ou aquelas que apresentavam CL pequeno ($< 2 \text{ cm}^3$) no d0 (início do protocolo de SOV).

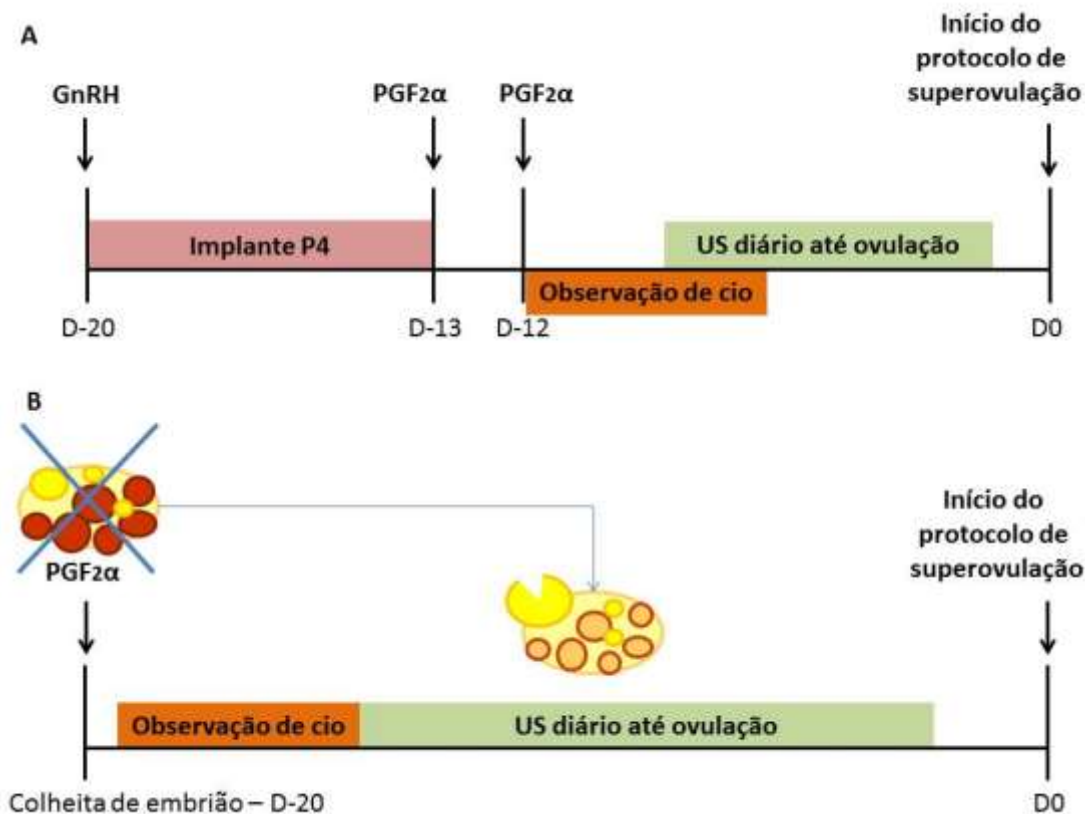


Figura 5 – A: Sincronização da ovulação antes do início do primeiro e terceiro protocolo de superestimulação. B: Após a lise dos CLs oriundos da primeira SOV de cada período, iniciou-se a observação de estro com posterior avaliação ultrassonográfica diária dos ovários até a ovulação. GnRH: Gonadorelina; P4: Progesterona; D: dias relativos ao início do protocolo de superestimulação; PGF2α: Prostaglandina F2α; US: Ultrassonografia

4.3 Colheita e classificação dos embriões

As colheitas de embriões foram realizadas 15 dias após o início do protocolo de SOV (7 dias após a indução da ovulação com GnRH; Figura 3). Após tricotomia do espaço epidural as vacas receberam 5 mL de Lidocaína 2% (Lidovet, Bravet, Rio de Janeiro, Brasil). Foi realizada limpeza da vulva com água e álcool 70%. O catéter de Foley (siliconado, 30cc, 20FR, Agtech, EUA) foi inserido através da cérvix com auxílio de mandril e posicionado no corpo do útero, ficando o balão inflado caudal à bifurcação uterina. Após adaptação do sistema contendo equipo, filtro 75 µm (Filtro coletor WTA, Cravinhos, Brasil) e solução para lavagem (Dulbecco modificado – DPBS Flush, Nutricell, Campinas, Brasil), a colheita de embriões foi realizada através da técnica de dupla lavagem dos cornos uterinos descrita por Castro Neto et al. (2005). Após a primeira lavagem, o útero foi preenchido com DMPBS e o catéter mantido no mesmo local com sua abertura lacrada com presilha de filtro de colheita. A vaca era então solta no piquete e 30 minutos depois era realizada a segunda lavagem. Foram utilizados, no total, aproximadamente 2 litros de DPBS por vaca. A colheita foi realizada por

três diferentes técnicos. A lavagem uterina foi realizada apenas nas vacas com três ou mais CLs.

Para luteólise, na primeira SOV de cada período, as vacas receberam duas doses de 500 µg de PGF2α (Sincrocio, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP; com intervalo de 12 horas entre elas) sendo a primeira imediatamente após a segunda lavagem dos cornos uterinos. Já na segunda SOV de cada período as duas doses de PGF2α foram administradas após biópsia hepática (que será descrita a seguir; no D16 do protocolo de SOV), também com 12 horas de intervalo entre elas.

No laboratório os filtros foram lavados com DMPBS e o conteúdo colocado em placas de Petri com posterior procura e recuperação dos embriões em estereomicroscópio. Os embriões foram classificados conforme o estágio de desenvolvimento (não fecundados, mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido) e grau de qualidade, sendo os embriões Grau I e II considerados congeláveis, Grau I-III viáveis e Grau IV degenerados (ROBERTSON; NELSON, 1998).

4.4 Biópsia hepática

Biópsias hepáticas foram realizadas no dia posterior à colheita de embrião (dia 16 do protocolo de SOV, na segunda SOV de cada período de 70 dias, ou seja, uma vez em cada período), 4 horas após o fornecimento da dieta. Após tricotomia do flanco direito, anestesia local com 10 mL de lidocaína 2% (Lidovet, Bravet, Rio de Janeiro, Brasil) e assepsias com iodo 10% e álcool 70%, foi feita uma pequena incisão de pele com bisturi no 11º espaço intercostal, 12 cm ventral à coluna vertebral. O fígado foi acessado com agulha de biópsia 14G x 15 cm (TRU-CUT, Biocompany, Brasil). O fragmento hepático foi lavado com água Milli-Q e mergulhado em 500 µL de solução estabilizante de RNA (RNAlater®, Ambion Inc, Austin, EUA) contido em criotubos livres de RNA. As amostras foram armazenadas a 4°C por 24 horas, -20°C por 72 horas e em seguida a -80°C até avaliação. Após a biópsia todas as vacas receberam antibioticoterapia na dosagem de 20.000 UI de penicilina benzatina por kg de peso corporal em dose única via intramuscular (Pencivet Plus, Schering, Brasil). A incisão foi coberta com pasta contendo repelente (Unguento Pearson, Eurofarma, Brasil) e limpada diariamente nos dias que sucederam a biópsia.

4.5 Teste de tolerância à glicose

No total, 21 vacas foram submetidas ao TTG realizado 5 dias após à última colheita de embrião (no final do estudo). As vacas foram mantidas em jejum de 12 horas. Para avaliar

concentrações basais de glicose e insulina, foi colhido sangue 20 minutos, 10 minutos e imediatamente antes da infusão de glicose que demorou, em média, 8 minutos. Cada vaca recebeu, através da veia jugular, infusão de 300 mg de glicose (Glicose 50%, Fresenius Kabi, Aquiraz, Brasil) por kg de peso corporal. Para a infusão foi utilizado equipo macrogotas e agulhas 40 mm x 1,6 mm. As colheitas seriadas de sangue foram realizadas 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos após o término da infusão de glicose. Foram colhidas amostras em tubos Vacuntainer® heparinizados para dosagem de insulina ou contendo citrato de sódio para dosagem de glicose. As amostras foram estocadas em gelo até a centrifugação (15 minutos, 4°C, 1700 g). Em seguida o soro foi transferido para microtubos e estocado a -20°C até análise.

Não foi realizada sincronização da ovulação anteriormente ao TTG pelo fato de as vacas terem recebido PGF2 α 3,5 dias antes, em função da SOV.

4.6 Dosagens Hormonais

Amostras sanguíneas foram colhidas em tubos Vacuntainer® heparinizados (para dosagem de insulina e glicose) e em tubos sem anticoagulante (para dosagem de P4) no dia 14 do protocolo de SOV (dia que antecedeu a colheita de embrião) imediatamente antes do fornecimento do alimento (no período da manhã, portanto, após jejum de aproximadamente 14 horas) e 4 horas após. Após as colheitas os tubos foram centrifugados (1700 g, 4°C, 15 minutos) para obtenção de plasma e soro, pipetados em microtubos e mantidos a -20°C.

As concentrações de P4 foram determinadas através da técnica de radioimunoensaio (RIE) no Laboratório do Prof. Milo Wiltbank (Madison, WI, EUA) utilizando kit comercial (ImmuChem™ Progesterone CT, 07-270105, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante exceto a incubação, na qual as amostras permaneceram *overnight* à temperatura ambiente. A sensibilidade do ensaio é de 0,02 ng/mL e os coeficientes de variação (CV) intra e interensaio foram de 8,9 e 4,2%, respectivamente.

As concentrações de insulina foram determinadas a partir da técnica de RIE usando o kit PI-12K Porcine Insulin (EMD Millipore Billerica, MA) também no Laboratório do Prof. Milo Wiltbank (Madison, WI, EUA). A sensibilidade do teste é de 1,611 μ UI/mL com 90% de especificidade para insulina bovina. Os CV intra e interensaio foram 2,5 e 3,0%, respectivamente.

As concentrações de glicose foram determinadas utilizando-se o kit enzimático Glicose Liquiform (Ref.: 85, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se filtro de absorvância de 505 nm em Sistema

Automático para Bioquímica – Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil) no Laboratório da Profa. Carla Maris Bittar na ESALQ/USP. A sensibilidade do teste é de 0,01 mg/dL. Os CV intra e interensaio foram 1,3 e 1,7%, respectivamente.

4.7 Expressão gênica (RT-qPCR)

4.7.1 Extração de RNA

A análise de expressão de mRNA das enzimas hepáticas foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP. As amostras hepáticas foram mantidas a -80°C até a análise. A extração de RNA foi realizada com TRIzol® (Fenol + Isotiocianato de guanidina, Invitrogen, Brasil) de acordo com o protocolo do fabricante (adaptação do método descrito por Chomczynski e Sacchi [1987]). Aproximadamente 100 mg de cada amostra hepática foram colocados em tubos de 5 mL contendo 1 mL de TRIzol® e macerados com homogeneizador (T10 Ultra Turrax, IKA). Após 5 minutos de descanso, o conteúdo macerado foi repassado para microtubo de 1,5 mL ao qual foram adicionados 200 μL de clorofórmio seguido de agitação e, novamente, descanso de 5 minutos à temperatura ambiente. Após, os microtubos foram centrifugados (11.400 g, 15 minutos, 4°C) e 400 μL da fase superior aquosa foram repassados para outro microtubo, onde foram adicionados 500 μL de isopropanolol seguido de vórtex. Após 10 minutos à temperatura ambiente os microtubos foram centrifugados novamente (8.120 g, 10 minutos, 4°C). O isopropanolol foi descartado permanecendo nos microtubos apenas o pellet contendo RNA, ao qual foi adicionado 1 mL de etanol 75%, seguido de vórtex para desprendimento do *pellet*. Os microtubos foram novamente centrifugados (5.440 g, 6 minutos, 4°C) e o sobrenadante descartado. Os microtubos foram colocados em máquina de vácuo (MiVac, Genevac) por aproximadamente 10 minutos para total evaporação do etanol. O *pellet* foi ressuscitado em 20 μL de água DEPC (0,1% dietilpirocarbonato) com posterior quantificação do RNA extraído por meio de espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, USA) usando fator de correção 40, para RNA. A relação entre as absorbâncias de 260 e 280 ficou entre 1,70 e 2,08 para todas as amostras.

A integridade das amostras foi avaliada através de corrida em gel de agarose 1% usando tampão TBE 1x (Tris-Ácido-Bórico-EDTA) e cuba (Horizon, Model 11.14, Life Technologies). Em cada poço do gel foram colocados 1 μL da amostra + 0,5 μL de Gel Red + 2 μL de Bromofenol. A corrida durou aproximadamente 45 minutos a 88 volts (Aparelho voltagem modelo 250, Life Technologies). A leitura da corrida foi feita com lâmpada

ultravioleta. As amostras foram consideradas íntegras quando as bandas 18 e 28s eram visualizadas. Amostras com bandas ausentes foram extraídas novamente, seguindo o mesmo processo.

4.7.2 Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA foi utilizado o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, EUA) e 1,5 µg de RNA total de cada amostra. A quantidade de amostra suficiente para obter 1,5 µg de RNA foi homogeneizada com água DEPC para totalizar um volume final de 2,5 µL. À essa solução foi acrescentado 1 µL de DNase para remover possível contaminação com DNA, 1 µL de Buffer e 0,5 µL de RNase (RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, EUA), totalizando 5 µL. O microtubo de cada amostra permaneceu por 30 minutos a 37°C no termociclador (Bio Rad, T100 Thermal Cycler). Após, foi acrescentado 1 µL de EDTA, seguido por 10 minutos no termociclador a 65°C. A etapa seguinte constituiu da adição de 1 µL de Oligo(dT)₂₀ e 1 µL de Annealing Buffer, ambos do kit. O volume final, 8 µL, foi colocado novamente no termociclador por 5 minutos a 65°C. Depois, as amostras foram resfriadas em gelo por 1 minuto e cada microtubo recebeu 10 µL de 2X First-Strand Reaction Mix e 2 µL de SuperScript®III/RNaseOUT Enzyme Mix, também do kit. A solução foi homogeneizada com pipetagem e colocada novamente no termociclador, para permanecer a temperatura de 50°C por 50 minutos seguido de 85°C por 5 minutos. O cDNA resultante foi estocado a -20°C.

Para avaliação da integridade de cDNA foi realizada uma PCR utilizando *primer* para o gene de referência RPL19 (Proteína ribossomal L19). Inicialmente foi feito um mix contendo 1 µL *Buffer*, 0,3 µL MgCl₂, 0,25 µL dNTP, 0,4 µL de *primer forward* e 0,4 µL de *primer reverse* do gene de referência, 0,1 µL Taq polimerase (Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, EUA) e 6,55 µL de água DEPC, para cada amostra. 9 µL desse mix foram homogeneizados com 1 µL de cDNA. Essa solução permaneceu no termociclador passando pelas seguintes etapas: 1) 5 minutos a 95°C; 2) 30 segundos a 95°C; 3) 30 segundos a 58°C; 4) 30 segundos a 72°C (etapas 2, 3 e 4 repetidas 35 vezes); 5) 5 minutos a 72°C; 6) 4°C até as amostras serem retiradas. Após corrida em gel de Agarose 1%, amostras cuja banda de 361 bp relativa ao gene RPL19 não foi visualizada, foram descartadas.

4.7.3 Seleção de *primers* e genes de referência

Os pares de *primers* para cada um dos genes estudados foram selecionados baseando-se na sequência disponível no GenBank para a espécie bovina e adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda e Life Technologies Brasil (São Paulo, SP; Tabela 2). Todos os *primers* foram otimizados para amplificarem a 58°C. A especificidade dos produtos de RT-qPCR foi confirmada através da eletroforese de gel de agarose. Além disso, foi realizada a análise da curva de *melting* para a verificação da temperatura de desnaturação do produto amplificado, conforme descrito por Zaros et al. (2007).

O programa para avaliação da eficiência dos genes, escolha da melhor diluição e para a obtenção da expressão foi o Light Cycler 480 Software versão LCS480 1.5.0.39 da Roche através de curva formada por quatro pontos (quatro diluições).

Os genes de referência escolhidos para controle interno (mais estáveis e com melhor eficiência) foram: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e Peptidilpropil isomerase A ou ciclofilina A (PPIA). Todos os *primers* utilizados tiveram eficiência acima de 1,9 (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequência de primers utilizados na análise de expressão gênica

Gene ¹	Sequência do primer 5' - 3' (<i>Forward</i> e <i>Reverse</i>)	Pares de bases	Núm. de acesso (GenBank)
CYP3A4	F = GGCTCTGTAAGAAGGATGTGG	189	NM_001099367 .1
	R = CCAGTTCCAAAAGGCAGGTA		
CYP2C19	F = CAAGAATCCCTGGACCTCAA	193	NM_001109792 .1
	R = GCTTCAGCAGGAGCAGGAG		
AKR1C4	F = ACCAGCCTTGGAAGTCAC	186	NM_181027.2
	R = TCGTTCCTTACTTCTCCA		
AKR1D1	F = AGGACTCAAGGACCTCCA	186	NM_001192358 .1
	R = ACTTCACCAAGCCAGCATCT		
GAPDH	F = GCGTGAACCACGAGAAGTATAA	119	NM_001034034 .2
	R = CCCTCCACGATGCCAAAGT		
PPIA	F = TCTGAGCACTGGAGAGAAAGG	178	NM_178320.2
	R = GATGCCAGGACCTGTATGCT		

¹ CYP2C19 = Citocromo P450, família 2, Subfamília C, polipeptídeo 19; CYP3A4 = Citocromo P450, família 3, Subfamília A, polipeptídeo 4; AKR1C4 = Aldo-keto redutase, família 1, membro C4; AKR1D1 = Aldo-keto redutase, família 1, membro D1; GAPDH = Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; PPIA = Peptidilpropil isomerase A (ciclofilina A)

4.7.4 PCR quantitativo (RT-qPCR)

As análises de expressão gênica foram realizadas através do aparelho Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) utilizando o kit Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche). Para a reação foram utilizados: Placas brancas de 96 poços com selo transparente (LightCycler 480 Multiwell Plate, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) 1 µL de cDNA diluído oito vezes, 5 µL do Mix SYBR Green, 0,8 µL de cada *primer* (*Forward* e *reverse*) e 2,4 µL de água, totalizando 10 µL para a reação. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

O programa utilizado para realização da PCR foi constituído de pré-incubação a 95°C por 5 minutos seguido de 40 ciclos para amplificação, anelamento e extensão, com as seguintes temperaturas e tempos, respectivamente: 95°C por 15 segundos, 58°C 20 segundos, 72°C por 20 segundos. A curva de *melting*, para confirmar a especificidade do amplicon, foi obtida da seguinte forma: 95°C por 5 segundos, 75°C por 1 minuto seguido de elevação a 95°C. Os dados foram obtidos em forma de *threshold cycles* (CT).

4.8 Cálculos

Com os dados do TTG foi avaliado, tanto para insulina como para a glicose, a taxa de decaimento (k), o tempo de meia vida ($T^{1/2}$) e a área sob a curva (ASC) 60 e 120 minutos após a infusão a partir do T_5 (5 minutos após a infusão). Fórmulas utilizadas:

$$k \text{ (%/min)} = (([T_{10}] - [T_{40}]) / (T_{40} - T_{10})) * 100$$

$$T^{1/2} \text{ (min)} = (0,693/k) * 100$$

ASC = $((B + b) * h) / 2$ - (Método trapezoidal descrito por Opsomer et al. [1999]: Média das concentrações do intervalo desejado multiplicado pelo tempo entre as duas concentrações).

A resposta do TTG também foi apresentada como: **pico de concentração, Δ Máximo da insulina ou da glicose** (incremento de insulina ou glicose = [insulina ou glicose] do pico – [insulina ou glicose] basal). Também foi calculado um índice de resistência á insulina, o HOMA-IR (*Homeostasis model assessment of insulin resistance*, de acordo com Hackbart et al. [2013]):

$$\text{HOMA-IR} = ([\text{glicose (mmol/mL)}] * [\text{insulina } \mu\text{UI/dL}]) / 22,5.$$

4.9 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do Procedimento MIXED do SAS Versão 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC). Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste

de normalidade. O conjunto de dados que não respeitou essa premissa foi submetido à transformações logarítmicas ou raiz quadrada e quando, após a transformação, ainda assim não apresentou distribuição normal, foi realizado teste estatístico não paramétrico. O teste não paramétrico utilizado foi Kruskal Wallis, e o ranqueamento dos dados foi feito por meio do Procedimento RANK do SAS. A matriz de covariância utilizada foi a “compound symmetry”. O ajuste de Kenward-Rogers foi o método usado para determinar os graus de liberdade. A diferença entre os tratamentos foi considerada significativa quando os valores de probabilidade de P apresentavam-se $\leq 0,05$. Os dados que apresentaram normalidade estão apresentados na forma de média dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média dos quadrados mínimos. No entanto, os que não apresentaram distribuição normal, e foram transformados ou analisados através de teste não paramétricos, estão apresentados na forma de média \pm erro padrão da média.

Para a análise dos dados contínuos como tamanho do folículo ovulatório, resposta superestimulatória e superovulatória, dados relacionados à produção e qualidade dos embriões, assim como concentrações hormonais e o HOMA-IR, foi incluído no modelo efeito fixo de tratamento, SOV, período, sequência dos tratamentos e a interação entre tratamento e SOV. Vaca dentro de sequência foi considerado efeito aleatório. Para análise dos dados contínuos do TTG relacionados à insulina e glicose como concentrações basais, k, $T_{1/2}$, tempo para o pico, pico, delta máximo e a ASC, foi incluído no modelo efeito fixo de tratamento e ECC. Para análise de correlação foi utilizado Pearson por meio do Procedimento CORR do SAS.

Os dados de medida repetida no tempo de glicose e insulina durante o TTG foram analisados através do procedimento Mixed do SAS Versão 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC). incluindo no modelo efeito fixo de tratamento e tempo e a interação entre tratamento e tempo. Quando o teste-F para a interação foi significativa, foi usado o comando SLICE no SAS.

Os dados de expressão gênica das enzimas hepáticas foram analisados incluindo no modelo efeito fixo de tratamento, período e sequência dos tratamentos, assim como efeito aleatório de vaca dentro de sequência. Esses dados são apresentados usando o método comparativo desenvolvido por Livak e Schmittgen (2001) usando o grupo milho como referência para a expressão relativa de RNAm, o qual foi considerado o valor “1”. Os dados foram analisados na forma de $\Delta\Delta Ct$ com seus respectivos intervalos de confiança. O ΔCt foi obtido a partir da diferença entre o número de Ct no gene de interesse e a média geométrica dos genes de referências de acordo com Vandesompele et al. (2002). Os $\Delta\Delta Ct$ foram obtidos

a partir da diferença da média dos quadrados mínimos do ΔC_t entre os tratamentos sendo o grupo milho o de referência (YUAN et al., 2006).

5 RESULTADOS

Escore de condição corporal

Não houve efeito de tratamento ($P = 1,00$), de tempo (45, 70, 90 e 140 dias de experimento; $P = 0,20$), interação entre tempo e tratamento ($P = 0,39$), nem efeito de período ($P = 0,09$) no ECC. Vacas do grupo milho e polpa cítrica apresentaram ECC médio \pm EP de $3,33 \pm 0,11$ ao longo de todo período experimental.

Hormônios e metabólitos

A dieta à base de milho proporcionou maior concentração basal de insulina circulante (Hora 0 - imediatamente antes do fornecimento do alimento) comparado à dieta à base de polpa cítrica (efeito de tratamento: $P < 0,01$; Tabela 3). Não houve efeito de tempo nem interação entre tempo e tratamento.

A concentração basal de P4 circulante no dia anterior à colheita de embriões (d14 do protocolo de SOV, 6 dias após indução da ovulação com GnRH) foi maior no grupo polpa cítrica comparado ao grupo milho (efeito de tratamento: $P = 0,01$). Efeitos de tempo e interação não foram detectados (Tabelas 3 e 4).

Quatro horas após o fornecimento da dieta a concentração circulante de P4 aumentou em ambos os grupos e se igualou ($P = 0,08$), não havendo efeito de tratamento ou de tempo, apenas interação: o grupo polpa cítrica apresentou maior concentração de P4 circulante 4 horas após o fornecimento do alimento aos 35 dias comparado aos 70 dias (Tabelas 3 e 4).

Considerando a relação entre a hora 4 e hora 0, a concentração de P4 circulante aumentou em maiores proporções no grupo milho comparado ao grupo polpa cítrica (efeito de tratamento: $P = 0,01$; Tabela 3). Também houve efeito de tempo: a P4 aumentou em maiores proporções aos 35 dias comparado aos 70 dias ($P < 0,01$; Tabela 3), independente de tratamento. Não houve interação.

A concentração de glicose apresentou efeito de tratamento ($P = 0,02$) e de tempo ($P < 0,01$): foi maior no grupo polpa cítrica e também na segunda SOV de cada período (aos 70 dias). Não houve interação entre tempo e tratamento na glicose circulante basal (Tabelas 3 e 4).

Para o HOMA-IR foi observado efeito de tratamento, apenas, sendo que o índice foi maior para o grupo milho ($P < 0,01$; Tabela 3) um dia antes a colheita de embriões.

Tabela 3 - Média \pm EP da concentração circulante de insulina, P4 e glicose e HOMA-IR de acordo com os tratamentos e de acordo com o tempo independente de tratamento

Variável	Tratamento		Tempo		Valor de P		
	Milho	Polpa cítrica	35 dias ^a	70 dias ^b	Trat	Tempo	Trat*Tempo
Total de observações	44	44	44	44			
<i>Insulina (μUI/mL)^c</i>							
Hora 0 ^d	15,8 \pm 0,9	11,5 \pm 0,9	13,9 \pm 0,9	13,4 \pm 0,9	<0,01	0,54	0,79
<i>Progesterona (ng/mL)^c</i>							
Hora 0 ^d	13,2 \pm 1,8	18,3 \pm 2,1	16,73 \pm 2,0	14,8 \pm 1,9	<0,01	0,07	0,19
Hora 4 ^e	16,2 \pm 2,1	19,2 \pm 2,2	18,9 \pm 2,2	16,4 \pm 2,1	0,08	0,054	0,01
Relação entre hora 4 e hora 0	1,27 \pm 0,05	1,07 \pm 0,02	1,19 \pm 0,04	1,15 \pm 0,04	<0,01	<0,01	0,19
<i>Glicose (mg/dL)^c</i>							
Hora 0 ^d	62,0 \pm 0,6	63,5 \pm 0,6	61,9 \pm 0,6	63,6 \pm 0,6	0,02	<0,01	0,66
<i>HOMA-IR^f</i>							
	2,36 \pm 0,14	1,86 \pm 0,14	2,08 \pm 0,14	2,13 \pm 0,14	<0,01	0,72	0,60

^a Primeira SOV de cada período^b Segunda SOV de cada período^c Colheita de sangue realizada no dia 14 do protocolo de SOV (dia anterior à colheita de embriões)^d Colheita de sangue realizada imediatamente antes do fornecimento do alimento^e Colheita de sangue realizada 4 horas após o fornecimento do alimento^f *Homeostasis model assessment of insulin resistance* ou modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina. Calculado a partir do valor de insulina e glicose obtido na hora 0 do d14 do protocolo de SOV

Tabela 4 - Média \pm EP da concentração circulante de insulina, P4 e glicose e HOMA-IR de acordo com o tempo, nos dois tratamentos

Parâmetro	Tratamento				Valor de P		
	Milho		Polpa cítrica		Trat	Tempo	Trat* Tempo
	35 dias ^a	70 dias ^b	35 dias ^a	70 dias ^b			
Total de observações	22	22	22	22			
<i>Insulina (μUI/mL)^c</i>							
Hora 0 ^d	15,9 \pm 1,1	15,6 \pm 1,1	12,0 \pm 1,1	11,1 \pm 1,1	<0,01	0,54	0,79
<i>Progesterona (ng/mL)^c</i>							
Hora 0 ^d	13,1 \pm 2,5	13,3 \pm 2,6	20,3 \pm 3,0	16,3 \pm 3,0	<0,01	0,07	0,19
Hora 4 ^e	16,0 \pm 3,0	16,4 \pm 2,9	21,8 \pm 3,1 ^A	16,5 \pm 3,1 ^B	0,08	0,054	0,01
Relação entre hora 4 e hora 0	1,29 \pm 0,07	1,26 \pm 0,07	1,10 \pm 0,03	1,04 \pm 0,03	<0,01	<0,01	0,19
<i>Glicose (mg/dL)^c</i>							
Hora 0 ^d	61,0 \pm 0,8	63,0 \pm 0,8	62,8 \pm 0,8	64,2 \pm 0,8	0,02	<0,01	0,66
<i>HOMA-IR^f</i>							
	2,29 \pm 0,18	2,42 \pm 0,18	1,87 \pm 0,17	1,84 \pm 0,18	<0,01	0,72	0,60

^{AB} Médias diferentes na linha apresentam diferença estatística (P < 0,05)

^a Primeira SOV de cada período

^b Segunda SOV de cada período

^c Colheita de sangue realizada no dia 14 do protocolo de SOV (dia anterior à colheita de embriões)

^d Colheita de sangue realizada imediatamente antes do fornecimento do alimento

^e Colheita de sangue realizada 4 horas após o fornecimento do alimento

^f *Homeostasis model assessment of insulin resistance* ou modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina. Calculado a partir do valor de insulina e glicose obtido na hora 0 do d14 do protocolo de SOV

Pré-sincronização

O tamanho médio \pm EP dos folículos ovulados naturalmente ($n = 37$) previamente ao início dos protocolos de SOV foi de $14,79 \pm 0,60$ e $14,42 \pm 0,63$ mm para os tratamentos milho e polpa cítrica, respectivamente. Não houve efeito de tratamento ($P = 0,63$), tempo ou interação. Portanto, o tamanho dos folículos ovulados a partir da pré-sincronização ou do ciclo posterior à luteólise dos CLs oriundos da primeira SOV de cada período, não foi diferente.

Houve efeito de tempo na taxa de ovulação natural durante a pré-sincronização: a proporção de vacas que ovularam na pré-sincronização realizada antes da primeira SOV foi maior comparada àquela realizada antes da segunda SOV: 84,1% (37/44) vs. 61,4% (27/44), respectivamente ($P = 0,02$).

Os dados relacionados à pré-sincronização (manifestação de cio, taxa de ovulação, tamanho de folículo ovulatório, número de vacas que receberam GnRH, dispositivo extra ou que foram aspiradas) são apresentados na tabela 5.

Resposta superestimulatória, superovulatória e produção de embriões

Foram colhidas, no total, 891 estruturas (Tabela 6) de 88 vacas superestimuladas. Desse total de vacas, 81 (92%) responderam ao protocolo de SOV (apresentando ≥ 3 CLs), 75 vacas (85,2%) produziram estruturas, 66 vacas (75%) produziram embriões e 53 vacas (60,2%) foram responsáveis por produzir todos os embriões viáveis ($n = 317$), sendo que cada uma gerou entre 1 e 28 embriões viáveis.

A segunda lavagem uterina possibilitou a recuperação de 278 estruturas. Dentre elas, 109 embriões viáveis, que corresponderam a 34,3% do total de embriões viáveis obtidos no estudo (Tabela 6).

Foram colhidas, no total, 28 zonas pelúcidas vazias (22 na colheita e 6 na recolheita), que não foram incluídas em nenhum dos parâmetros da tabela 6.

Tabela 5 - Dados relacionados à pré-sincronização realizada antes de cada superovulação

Pré-sincronização	Tratamento	Cio, % (n/n)	Ovulação natural, % (n/n)	Folículo ovulatório, mm	GnRH ¹ , n	Aspiradas ² , n	Dispositivo extra d0 ³ , n
1	Milho	100,0 (11/11)	90,9 (10/11)	13,5	1	0	0
1	Polpa cítrica	100,0 (11/11)	100,0 (11/11)	14,0	0	0	0
2	Milho	90,9 (10/11)	72,7 (8/11)	14,7	0	2	3
2	Polpa cítrica	81,8 (9/11)	72,7 (8/11)	13,2	0	0	3
3	Milho	90,9 (10/11)	81,8 (9/11)	14,4	2	0	0
3	Polpa cítrica	100,0 (11/11)	63,6 (7/11)	13,3	4	2	1
4	Milho	90,9 (10/11)	63,6 (7/11)	15,8	4	2	2
4	Polpa cítrica	81,8 (9/11)	36,3 (4/11)	15,0	7	6	2

¹ Vacas que não ovularam receberam 200 µg GnRH (Cystorelin, Merial, Hospira, KA, EUA)

² Vacas que não ovularam naturalmente ou ao GnRH tiveram os folículos ≥17 mm aspirados

³ Vacas que não possuíam CL no primeiro dia do protocolo de SOV receberam 2 dispositivos intravaginais de P4

Tabela 6 - Total de embriões e estruturas produzidas em 88 SOVs, independente de tratamento, utilizando a técnica de dupla lavagem uterina

Parâmetro^a	Colheita	Recolheita	Total
Mórula	151	62	213
Blastocisto inicial	48	36	84
Blastocisto	9	11	20
Embriões congeláveis (GI e II)	176	87	263
Embriões GIII	32	22	54
Embriões viáveis (GI, II e III)	208	109	317
Embriões degenerados	135	67	202
Estruturas não fecundadas	270	102	372
Total	613	278	891

^a Classificação dos embriões realizada de acordo com Robertson; Nelson (1998)

Não houve efeito de tratamento nem interação entre tempo e tratamento na resposta superestimulatória, superovulatória ou na produção de embriões (Tabelas 7 e 8). No entanto, foi observado efeito de tempo, independente de tratamento, em diversas variáveis: a resposta superestimulatória ($P = 0,04$) e o número de estruturas não fecundadas ($P = 0,01$) foram maiores aos 70 dias. A proporção de embriões congeláveis ($P < 0,01$) e viáveis ($P < 0,01$) dentre o total de estruturas, a taxa de fecundação ($P < 0,01$) e a proporção de embriões congeláveis ($P = 0,02$) e viáveis ($P < 0,01$) dentre os fecundados foram maiores aos 35 dias (Tabela 7).

Tabela 7 - Média \pm EP da resposta superestimulatória, superovulatória e da produção de embriões de acordo com o tempo dentro de cada tratamento

Variável	Tratamento				Valor de P		
	Milho		Polpa cítrica		Trat	Tempo	Trat* Tempo
	35 dias ^a	70 dias ^a	35 dias ^a	70 dias ^a			
Superovulações e colheitas, n	22	22	22	22			
Folículos > 4 mm no dia do primeiro FSH (d4), n	36,3 \pm 3,6	33,5 \pm 3,7	34,7 \pm 3,5	35,5 \pm 3,6	0,93	0,70	0,46
Folículos > 8 mm no dia do último FSH (d7), n	21,9 \pm 2,5	24,0 \pm 2,6	23,1 \pm 2,5	24,0 \pm 2,6	0,71	0,33	0,70
Resposta superestimulatória ^b , %	59,1 \pm 4,4	71,4 \pm 4,8	69,1 \pm 4,4	73,4 \pm 4,8	0,14	0,04	0,32
Folículos ovulados, n	16,2 \pm 2,3	18,0 \pm 2,4	17,6 \pm 2,3	15,1 \pm 2,4	0,62	0,82	0,20
Resposta superovulatória ^b , %	72,5 \pm 5,4	74,4 \pm 5,6	73,6 \pm 5,4	63,6 \pm 5,4	0,22	0,30	0,13
CLs no dia da colheita, n	15,9 \pm 2,0	15,1 \pm 2,0	16,2 \pm 2,0	14,4 \pm 2,0	0,86	0,30	0,67
Taxa de recuperação ^b , %	55,5 \pm 7,4	72,0 \pm 7,8	56,0 \pm 7,0	61,7 \pm 7,4	0,47	0,10	0,42
Embriões congeláveis (GI e II)* ^c , n	3,3 \pm 0,9	2,1 \pm 0,7	3,5 \pm 1,0	3,6 \pm 1,4	0,70	0,08	0,57
Embriões viáveis (GI, II e III)* ^c , n	3,9 \pm 1,2	3,3 \pm 1,3	4,0 \pm 1,1	4,4 \pm 1,6	0,70	0,19	0,81
Embriões GI*, n	1,0 \pm 0,4	1,2 \pm 0,8	1,6 \pm 0,8	1,2 \pm 0,5	0,67	0,79	0,18
Embriões GII*, n	2,3 \pm 0,9	1,1 \pm 0,4	1,9 \pm 0,5	2,4 \pm 1,0	0,27	0,08	0,90
Embriões GIII*, n	0,5 \pm 0,4	0,9 \pm 0,4	0,4 \pm 0,1	0,7 \pm 0,3	0,50	0,08	0,38
Embriões degenerados*, n	2,2 \pm 0,7	2,6 \pm 0,9	2,9 \pm 0,8	2,2 \pm 0,5	0,63	0,75	0,91
Não fecundados*, n	4,2 \pm 1,7	6,0 \pm 1,6	3,8 \pm 1,1	4,4 \pm 1,0	0,93	0,01	0,60
Estruturas totais*, n	10,3 \pm 2,3	12,0 \pm 1,7	10,6 \pm 1,8	11,1 \pm 2,0	0,93	0,35	0,33
Escore de embrião* ^d	4,4 \pm 0,1	4,2 \pm 0,1	4,3 \pm 0,1	4,4 \pm 0,1	0,33	0,83	0,62
Embriões congeláveis (GI e II)*, %	42,3 \pm 8,9	16,0 \pm 4,6	37,0 \pm 7,8	21,6 \pm 5,8	0,82	<0,01	0,63
Embriões viáveis (GI, II e III)*, %	45,3 \pm 9,4	27,6 \pm 7,7	45,7 \pm 8,4	26,5 \pm 6,5	0,81	<0,01	0,60
Embriões degenerados*, %	22,0 \pm 6,0	22,9 \pm 6,7	24,4 \pm 4,9	27,0 \pm 7,3	0,42	0,83	0,98
Fecundação*, %	67,3 \pm 8,7	50,5 \pm 8,3	70,1 \pm 7,0	53,6 \pm 8,7	0,74	<0,01	0,88
Embriões congeláveis / fecundados*, %	51,4 \pm 9,0	30,1 \pm 7,0	48,2 \pm 8,1	39,6 \pm 9,0	0,82	0,02	0,47
Embriões viáveis / fecundados*, %	54,9 \pm 9,3	50,0 \pm 10,7	58,0 \pm 8,0	49,7 \pm 9,3	0,81	<0,01	0,60

^a SOV realizada aos 35 ou aos 70 dias de fornecimento da dieta

^b Cálculos: Resposta superestimulatória = (n folículos d7 x 100) / n folículos d4; Resposta superovulatória = (n CLs no d15 x 100) / n folículos d7; Taxa recuperação = (zonas vazias + total de estruturas) / número de CLs no d15

^c Classificação dos embriões realizada de acordo com Robertson; Nelson (1998)

^d Escore de embrião: 4 = Mórula; 5 = Blastocisto inicial; 6 = Blastocisto; 7 = Blastocisto expandido

*Dados analisados através do teste não paramétrico de Kruskal Wallis

Tabela 8 - Média \pm EP da resposta superestimulatória, superovulatória e da produção de embriões de acordo com o tratamento e de acordo com o tempo independente de tratamento

Variável	Tratamento		Tempo		Valor de P		
	Milho	Polpa cítrica	35 dias ^a	70 dias ^a	Trat	Tempo	Trat* Tempo
Superovulações e colheitas, n	44	44	44	44			
Folículos > 4 mm no dia do primeiro FSH (d4), n	34,9 \pm 3,2	35,1 \pm 3,2	35,5 \pm 3,2	34,5 \pm 3,2	0,93	0,70	0,46
Folículos > 8 mm no dia do último FSH (d7), n	23,0 \pm 2,3	23,5 \pm 2,3	22,5 \pm 2,3	24,0 \pm 2,3	0,71	0,33	0,70
Resposta superestimulatória ^b , %	65,3 \pm 3,6	71,2 \pm 3,5	64,1 \pm 3,5	72,4 \pm 3,6	0,14	0,04	0,32
Folículos ovulados, n	17,1 \pm 2,1	16,3 \pm 2,0	16,9 \pm 2,0	16,5 \pm 2,1	0,62	0,82	0,20
Resposta superovulatória ^b , %	73,4 \pm 4,7	68,6 \pm 4,7	73,0 \pm 4,7	69,0 \pm 4,7	0,22	0,30	0,13
CLs no dia da colheita, n	15,5 \pm 1,8	15,3 \pm 1,8	16,0 \pm 1,8	14,8 \pm 1,8	0,86	0,30	0,67
Taxa de recuperação ^b , %	63,7 \pm 5,9	58,9 \pm 5,6	55,7 \pm 5,6	66,9 \pm 5,9	0,47	0,10	0,42
Embriões congeláveis (GI e II)* ^c , n	2,7 \pm 0,6	3,6 \pm 0,8	3,4 \pm 0,7	2,9 \pm 0,8	0,70	0,08	0,57
Embriões viáveis (GI, II e III)* ^c , n	3,6 \pm 0,9	4,1 \pm 0,9	3,9 \pm 0,8	3,9 \pm 1,0	0,70	0,19	0,81
Embriões GI*, n	1,1 \pm 0,5	1,4 \pm 0,5	1,3 \pm 0,5	1,2 \pm 0,5	0,67	0,79	0,18
Embriões GII*, n	1,7 \pm 0,5	1,1 \pm 0,5	2,1 \pm 0,5	1,8 \pm 0,5	0,27	0,08	0,90
Embriões GIII*, n	0,7 \pm 0,3	0,6 \pm 0,1	0,5 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2	0,50	0,08	0,38
Embriões degenerados*, n	2,4 \pm 0,5	2,6 \pm 0,5	2,6 \pm 0,5	2,4 \pm 0,5	0,63	0,75	0,91
Não fecundados*, n	5,1 \pm 1,2	4,1 \pm 0,7	4,0 \pm 1,0	5,2 \pm 0,9	0,93	0,01	0,60
Estruturas totais*, n	11,1 \pm 1,4	10,8 \pm 1,3	10,5 \pm 1,4	11,5 \pm 1,3	0,93	0,35	0,33
Escore de embrião* ^d	4,3 \pm 0,1	4,3 \pm 0,1	4,3 \pm 0,1	4,3 \pm 0,1	0,33	0,83	0,62
Embriões congeláveis (GI e II)*, %	29,5 \pm 5,5	29,5 \pm 5,0	39,6 \pm 5,9	18,9 \pm 3,7	0,82	<0,01	0,63
Embriões viáveis (GI, II e III)*, %	36,7 \pm 6,2	36,1 \pm 5,4	45,5 \pm 6,2	27,0 \pm 4,9	0,81	<0,01	0,60
Embriões degenerados*, %	22,5 \pm 4,4	25,7 \pm 4,3	23,2 \pm 3,8	25,0 \pm 4,9	0,42	0,83	0,98
Fecundação*, %	59,1 \pm 6,1	61,9 \pm 5,7	68,7 \pm 5,5	52,0 \pm 6,0	0,74	<0,01	0,88
Embriões congeláveis / fecundados*, %	41,7 \pm 6,0	44,3 \pm 6,0	49,8 \pm 6,0	34,9 \pm 5,6	0,82	0,02	0,47
Embriões viáveis / fecundados*, %	52,7 \pm 6,9	54,2 \pm 6,0	56,4 \pm 6,0	49,9 \pm 6,9	0,81	<0,01	0,60

^a SOV realizada aos 35 ou aos 70 dias de fornecimento da dieta

^b Cálculos: Resposta superestimulatória = (n folículos d7 x 100) / n folículos d4; Resposta superovulatória = (n CLs no d15 x 100) / n folículos d7; Taxa recuperação = (zonas vazias + total de estruturas) / número de CLs no d15

^c Classificação dos embriões realizada de acordo com Robertson; Nelson (1998)

^d Escore de embrião: 4 = Mórula; 5 = Blastocisto inicial; 6 = Blastocisto; 7 = Blastocisto expandido

*Dados analisados através do teste não paramétrico de Kruskal Wallis

Teste de tolerância à glicose

A tabela 9 mostra os resultados obtidos no TTG realizado no final do estudo. O pico de glicose ($P = 0,05$) e a taxa de decaimento da glicose (k) foram maiores ($P = 0,01$) para o grupo milho, que também apresentou menor tempo de meia-vida ($P = 0,05$) e menor área sob a curva (ASC) entre os tempos 5 e 120 minutos ($P = 0,03$). A glicose basal, o tempo para ocorrência do pico e a ASC entre os tempos 5 e 60 minutos foi igual entre os tratamentos (Tabela 9). Não houve efeito de tratamento em nenhuma das variáveis relacionadas à insulina no TTG (Tabela 9).

Tabela 9 - Efeito da dieta na resposta da insulina e desaparecimento da glicose após o teste de tolerância à glicose (TTG; infusão de 0,3 g de glicose por kg de peso corporal) realizado no final do estudo^a. Dados apresentados como média ± EP

Item ^b	Milho	Polpa cítrica	Valor de P
Vacas submetidas ao TTG	10	11	
<i>Glicose</i>			
Basal (mg/dL) ^c	66,5 ± 1,9	67,7 ± 1,8	0,66
Pico (mg/dL)	240,8 ± 12,3	205,7 ± 11,7	0,05
Tempo para o pico (min)	5,0 ± 0,4	5,9 ± 0,4	0,14
k (%/min)	2,7 ± 0,2	1,9 ± 0,2	0,01
Δ Máx (mg/dL)	169,9 ± 17,5	134,1 ± 15,6	0,16
Tempo de ½ vida (min)	26,6 ± 2,0	33,3 ± 2,4	0,05
ASC ₅₋₆₀ [(mg/dL) × 60 min]	13.534 ± 940	15.292 ± 1.052	0,23
ASC ₅₋₁₂₀ [(mg/dL) × 120 min]	34.949 ± 2.683	44.009 ± 2.828	0,03
<i>Insulina</i>			
Basal (μUI/mL) ^c	20,0 ± 1,8	15,6 ± 1,7	0,09
Pico (μUI/mL)	171,7 ± 16,0	139,7 ± 15,2	0,16
Tempo para o pico (min)	18,0 ± 2,8	15,9 ± 2,7	0,58
k (%/min)	1,6 ± 0,4	1,5 ± 0,4	0,86
Δ Máx (μUI/mL)	151,7 ± 14,6	124,1 ± 14,0	0,19
Tempo de ½ vida (min)	47,4 ± 14,5	39,3 ± 12,4	0,68
ASC ₅₋₆₀ [(μUI/mL) × 60 min]	13.103 ± 1.337	10.592 ± 1.274	0,19
ASC ₅₋₁₂₀ [(μUI/mL) × 120 min]	24.220 ± 2.599	22.261 ± 2.478	0,60

^a Foi respeitado período de jejum de 12 horas

^b k = Taxa de decaimento ou taxa de *clearance*; Tempo de ½ vida = tempo para atingir metade da concentração máxima; ASC = área sob a curva no respectivo intervalo de tempo; Δ Máx = Concentração máxima de insulina ou glicose – insulina ou glicose basal (respectivamente);

^c Média das concentrações obtidas das amostras colhidas 20, 10 e 0 minutos antes do início da infusão de glicose

As Figuras 6 e 7 mostram o perfil de alteração nas concentrações circulantes de glicose e insulina durante o TTG, de acordo com os tratamentos. Houve efeito de tratamento (P = 0,03), tempo (P < 0,01) e interação entre tempo e tratamento (P < 0,01) nas concentrações circulantes de glicose. O grupo milho apresentou maior concentração circulante de glicose no momento 5 minutos (241,34 ± 9,51 vs. 211,85 ± 12,41 mg/dL; P = 0,03) enquanto que a polpa cítrica apresentou maiores concentrações circulantes de glicose nos momentos 40, 60, 80 e 100 minutos após a infusão (Figura 6).

Houve efeito de tempo (P < 0,01), apenas, nas concentrações circulantes de insulina em resposta à infusão de glicose. Tratamento (P = 0,28) e interação (0,07) não foram estatisticamente diferentes (Figura 7).

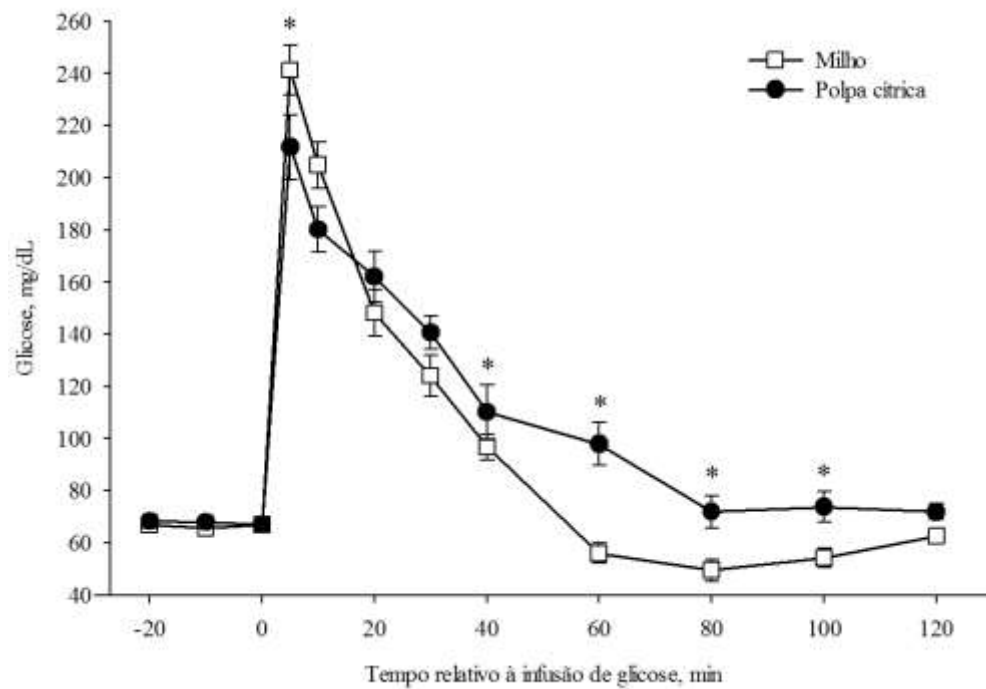


Figura 6 - Perfil da concentração de glicose circulante em resposta ao teste de tolerância à glicose (TTG; infusão de 0,3 g de glicose por kg de peso corporal) de acordo com o tratamento, realizado no final do estudo (n = 10 no grupo milho; n = 11 no grupo polpa cítrica). Houve efeito de tratamento ($P = 0,03$), de tempo ($P < 0,01$) e interação entre tempo e tratamento ($P < 0,01$). Asterisco (*) indica diferença entre os tratamentos no respectivo tempo

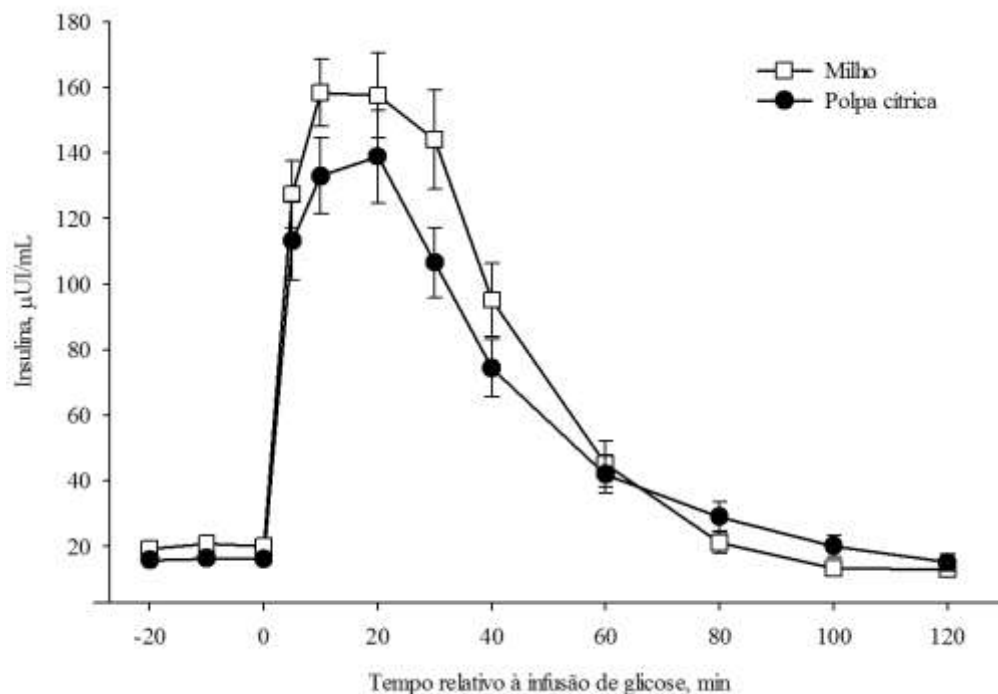


Figura 7 - Perfil da concentração de insulina circulante em resposta ao teste de tolerância à glicose (TTG; infusão de 0,3 g de glicose por kg de peso corporal) de acordo com tratamento, realizado no final do estudo (n = 10 no grupo milho; n = 11 no grupo polpa cítrica). Não houve efeito de tratamento ($P = 0,28$) nem interação ($P = 0,07$), apenas efeito de tempo ($P < 0,01$).

Houve correlação positiva entre o HOMA-IR e o pico de insulina ($R^2 = 0,71$; $P < 0,01$; Figura 8), e entre o HOMA-IR e o Delta máximo de insulina ($R^2 = 0,64$; $P < 0,01$; dados não apresentados) do TTG, independente de tratamento.

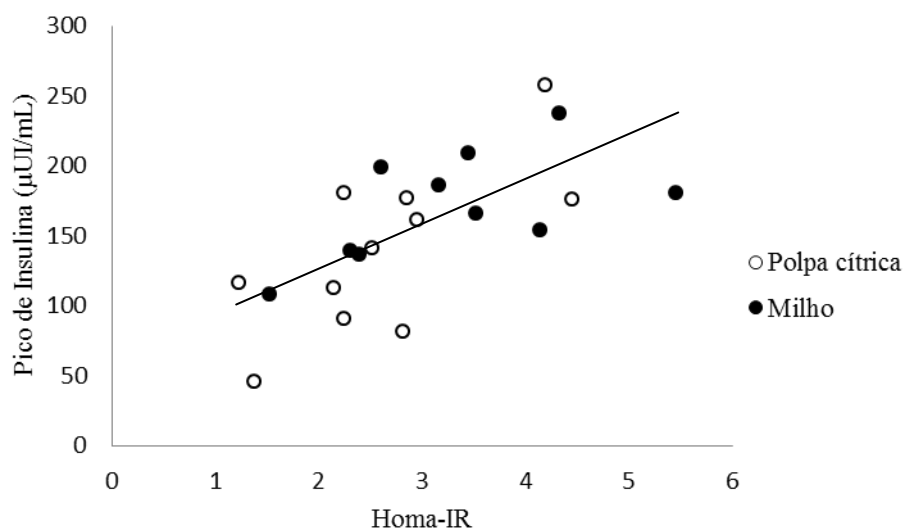


Figura 8 - Relação entre HOMA-IR e pico de insulina ($\mu\text{UI/mL}$) obtida no TTG ($R^2 = 0,71$; $P < 0,01$). Círculos preenchidos representam as observações de cada unidade experimental do grupo milho e círculos vazios representam as observações de cada unidade experimental do grupo polpa cítrica ($n = 21$)

Expressão gênica

A expressão gênica das enzimas hepáticas CYP2C19, CYP3A4, AKR1C4 e AKR1D1 não foi afetada pelos tratamentos (Tabela 10).

Tabela 10 - Expressão relativa de mRNA com 95% de intervalo de confiança das enzimas relacionadas a metabolização de progesterona (Citocromo P450 3A4 [CYP3A4], 2C19 [CYP2C19], Aldo-keto redutases 1D1 [AKR1D1] e 1C4 [AKR1C4]) em amostras hepáticas de acordo com os tratamentos.

Genes testados ^a	Milho*	Polpa cítrica*	Valor de P
Número de biópsias	16	19	
CYP2C19	1,00 -	0,93 (0,34 - 2,53)	0,87
CYP3A4	1,00 -	1,90 (0,30 - 11,87)	0,46
AKR1C4	1,00 -	1,19 (0,78 - 1,82)	0,37
AKR1D1	1,00 -	1,15 (0,79 - 1,70)	0,41

^a Para essa análise foram utilizados os seguintes genes de referência: Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH) e Peptidilpropil isomerase A ou Ciclofilina A (PPIA)

*Dados avaliados através de ΔCT e apresentados na forma de $\Delta\Delta\text{CT}$

6 DISCUSSÃO

Os principais achados desse estudo são de que vacas holandesas não lactantes e não gestantes recebendo dietas de manutenção, que diferem na fonte de carboidrato e produzem diferentes perfis de insulina e glicose basais, não apresentaram respostas superestimulatória, superovulatória, qualidade e quantidade de embriões colhidos diferentes e não se tornaram mais ou menos resistentes à insulina. No entanto, as concentrações circulantes de P4, tanto basal como pós-prandial, se mostraram diferentes sem que a expressão gênica das enzimas hepáticas que a metabolizam fosse influenciada. O estudo demonstrou ser possível aumentar a P4 circulante através da dieta e sugere um efeito positivo da insulina na capacidade esteroidogênica da célula luteal no período pós-prandial.

Efeito da dieta na insulina circulante

Condizente com o objetivo do estudo, a insulina basal foi maior para o grupo milho comparada ao grupo polpa cítrica (Tabela 3). Acredita-se que isso se deve a dois principais fatores: 1) Ingredientes compostos por alto amido, como o milho, em comparação aos que contém alta pectina, como a polpa cítrica, diminuem a relação acetato:propionato produzido no rúmen (BEN-GHEDALIA et al., 1989; BRODERICK; MERTENS; SIMONS, 2002) induzindo a maior liberação de insulina (OH et al., 2015; SMITH et al., 2006); e 2) Provavelmente no momento da amostragem, realizada pela manhã, estava ocorrendo digestão pós-ruminal do amido ingerido no último trato do dia anterior. Segundo Harmon (1993) quantidades variáveis de amido que escapam da fermentação ruminal são digeridas até glicose no intestino delgado por enzimas de origem pancreática ou produzidas pela própria mucosa intestinal (HARMON, 1993), enquanto que a pectina que escapa da fermentação ruminal não é digerida por enzimas do indivíduo e somente poderá servir como fonte energética quando fermentada à AGVs no intestino grosso, embora ela seja, na maioria das vezes, completamente fermentada no rúmen devido à sua alta taxa de degradação (VAN SOEST, 1994). De fato, os tratamentos foram eficientes em alterar a concentração de insulina circulante, apesar das dietas serem isoenergéticas e apesar do consumo diário ter sido igual entre os tratamentos.

Diferenças nos padrões de fermentação ruminal ou nos dados relativos à produção leiteira e desempenho de ruminantes recebendo milho e polpa cítrica são descritas em inúmeros estudos (BAMPIDIS; ROBINSON, 2006; BEN-GHEDALIA et al., 1989; BRODERICK; MERTENS; SIMONS, 2002). Entretanto, estudos que comparam os perfis de

insulina em ruminantes ingerindo milho ou polpa cítrica, são escassos. Moriel et al. (2008) forneceram suplementação de concentrados à base de polpa cítrica ou milho moído fino para vacas leiteiras não lactantes e não gestantes mantidas a pasto. No entanto, diferente do presente estudo, não foram observadas diferenças entre os tratamentos na insulina pré-prandial, provavelmente devido às diferenças de composição das dietas entre os trabalhos. A insulina mostrou-se diferente apenas quando comparadas as formas de processamento (com diferentes taxas de degradabilidade ruminal; MORIEL et al., 2008).

Efeito da insulina na P4 circulante e na expressão gênica de enzimas hepáticas

Uma das hipóteses do estudo era de que vacas recebendo dieta à base de milho e apresentando, portanto, maior insulina circulante, teriam menor expressão gênica das enzimas que metabolizam a P4 culminando com maior P4 circulante 4 horas após a ingestão de alimento. De fato, 4 horas após o fornecimento do alimento a P4 circulante aumentou em ambos os grupos e a relação da P4 entre a hora 4 e hora 0 foi maior para o grupo milho, embora a P4 circulante basal tenha sido maior para o grupo polpa cítrica (Tabelas 3 e 4). Até onde se sabe, esse é o primeiro estudo que mostra o aumento da P4 circulante após a ingestão de alimento, visto que estudos que aumentam a insulina circulante com propileno glicol (LEIVA et al., 2013) ou com a alta ingestão de alimento (SANGSRITAVONG et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003) observaram diminuição ou manutenção das concentrações circulantes de P4.

A P4 circulante nas vacas desse estudo é oriunda dos CLs provenientes de SOV, diferente de outros estudos nos quais as vacas eram ovariectomizadas, tiveram os folículos dominantes aspirados ou foram sincronizadas para não apresentarem CL e recebiam implantes de P4 ou P4 injetável para que fosse comparado o efeito da insulina na metabolização de P4 (COOKE et al., 2012; LEIVA et al., 2013; LEMLEY et al., 2010; MOORE et al., 2014; MORIEL et al., 2008; SMITH et al., 2006 VIEIRA et al., 2013). Embora o número de CLs tenha sido semelhante entre os grupos (Tabelas 7 e 8), não é possível afirmar que a diferença na P4 circulante tenha sido causada pelo tratamento, já que a concentração de P4 não foi algo controlado nesse estudo, além de haver potencial confundimento de outros fatores (como tamanho de folículo ovulado e idade do CL ou erro na contagem de CL em um ovário superovulado). Portanto, é mais pertinente discutir os incrementos na concentração de P4 (relação entre hora 4 e hora 0) ao invés da concentração de P4 propriamente dita. O porquê de vacas do grupo polpa cítrica terem apresentado maior P4 basal (Tabela 3) não foi elucidado.

Sangsritavong et al. (2002) associaram alta IMS com aumento de fluxo sanguíneo hepático em vacas leiteiras lactantes ou não lactantes e observaram maior *clearance* de P4 e E2 no período pós-prandial resultando na diminuição da concentração circulante desses hormônios esteroides. Diferente do que descreveram Sangsritavong et al. (2002), a concentração circulante de P4 no presente estudo não diminuiu no período pós-prandial (Tabelas 3 e 4). De fato, de acordo com Vasconcelos et al. (2003), o fornecimento de múltiplas e pequenas porções de alimento durante o dia elimina o efeito agudo da alta ingestão na metabolização da P4.

No presente estudo a dieta foi dividida em duas porções fornecidas com intervalo de 10 horas em um mesmo dia. Vasconcelos et al. (2003) observaram maior metabolização de P4, com diminuição da concentração circulante, em vacas lactantes e gestantes após o fornecimento do trato dividido em duas porções. No entanto, o presente estudo utilizou vacas não lactantes e não gestantes, cujas necessidades de manutenção e a quantidade de alimento ofertada foi menor. Portanto, é possível que tenha sido eliminado, nesse estudo, o efeito de confundimento do aumento do fluxo sanguíneo hepático pós-prandial ocasionado pela alta ingestão de alimento, o que permite ter acesso de forma mais assertiva à influência da insulina na metabolização de P4. Assim, levando em consideração a maior concentração de insulina circulante basal no grupo milho (Tabela 3), os dados desse estudo corroboram os resultados de vários autores a respeito do efeito “protetor” da insulina sobre a metabolização de P4 (COOKE et al., 2012; MORIEL et al., 2008; SMITH et al., 2006; VIEIRA et al., 2010). No presente estudo, no entanto, esse efeito “protetor” não foi relacionado à menor expressão gênica das enzimas que metabolizam a P4 (CYP2C19, CYP3A4, AKR1D1, AKR1C4), visto que não foi encontrada diferença na expressão gênica (Tabela 10), diferente do descrito por Lemley et al. (2008). Outros autores também não encontram diferença na expressão gênica dessas enzimas após estímulo com insulina (LEMLEY et al., 2010; MATTOS, 2012) enquanto que no estudo de Vieira et al. (2013) o desafio com insulina diminuiu a expressão das enzimas CYP2C19 e CYP3A4, mas não alterou a P4 circulante.

O fato de não ser possível confirmar a relação de causa e efeito entre a alta insulina circulante, diminuição da expressão gênica de enzimas hepáticas do citocromo P450 e aldo ketoreduases e aumento da P4 circulante em vacas, abre caminho para outras hipóteses que possam explicar o aumento da P4 após estímulo da insulina.

Nesse estudo, uma das hipóteses seria o aumento da capacidade esteroidogênica da célula luteal, estimulado pela insulina após a ingestão de alimento. Fatores de crescimento e hormônios metabólicos, incluindo somatotropina, insulina e IGF1, estão relacionados com a

regulação da função ovariana (GONG et al., 1993). A insulina possui efeito anabólico e é um potente estimulador da proliferação celular e da esteroidogênese em bovinos (WEBB et al., 2004). A ação tanto da insulina como do IGF1 em promover o aumento da produção de E2 e P4 pelo folículo é bastante conhecida (ECHTERNKAMP et al., 1994; SEKAR; GARMEY; VELDHUIS, 2000; SILVA; PRICE, 2002). Receptores de insulina foram identificados em células luteais de camundongos (LADENHEIM; TESONE; CHARREAU, 1984) e de bovinos, onde tanto a insulina como o IGF1 estimularam a produção de P4 *in vitro* (SAUERWEIN et al., 1992). Saragüeta et al. (1989) observaram que células luteais de camundongos cultivadas com insulina aumentaram a produção de P4. A insulina adicionada ao cultivo de células luteais oriundas de CLs de búfalas prenhes estimulou a produção de P4 independente da presença de LH no meio de cultivo e minimizou a perda de células mantendo maiores populações celulares sem induzir alterações morfológicas nas células (BAITHALU et al., 2013). Ovelhas que receberam semanalmente, durante todo o período gestacional, injeções subcutâneas de insulina, apresentaram maior P4 circulante ao longo da gestação (SAGUNA et al., 2009). Esses estudos mostraram haver um efeito favorável da insulina na esteroidogênese, uma potencial explicação para os resultados obtidos nesse estudo.

Uma segunda hipótese seria, ao invés da diminuição na expressão gênica das enzimas hepáticas, uma alteração pós-transcricional que determine menor catabolismo da P4. Lemley et al. (2010) forneceram dieta (isoenergética e isoproteica) de alta fibra vs. alto concentrado para vacas leiteiras holandesas lactantes com 80 dias em leite. Três horas após a ingestão, a insulina circulante foi 44% maior no grupo alto concentrado que também teve menor taxa de decaimento da P4 (oriunda de implante intravaginal). A expressão gênica não foi diferente entre os tratamentos, mas a atividade enzimática da CYP2C foi 45% menor no grupo alto concentrado. Os autores discutem que a análise de correlação não revela associação entre expressão gênica e atividade das enzimas do citocromo P450 que catabolizam a P4.

A partir disso, uma análise do perfil de insulina e P4 mais detalhada se faz necessária para compreensão da ação da insulina na concentração de P4 circulante no período pós-prandial, com auxílio de outras técnicas moleculares que avaliem mecanismos pós-transcripcionais, por exemplo.

Efeito da insulina na reprodução

Dentre as hipóteses do estudo está a de que a produção de embriões seria prejudicada com o fornecimento da dieta à base de milho. No entanto, a hipótese não foi confirmada e não houve diferença na produção de embriões entre os dois tratamentos (Tabelas 7 e 8).

O funcionamento do metabolismo e a reprodução estão intimamente interligados através de metabólitos e hormônios que funcionam como sinalizadores e tem suas concentrações aumentadas ou diminuídas em função do estado fisiológico do animal e de seu estado energético (BUTLER, 2000). Nesse contexto, a insulina é um hormônio crucial na regulação da distribuição e disponibilização de energia ao organismo, podendo influenciar o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (BROCKMAN; LAARVELD, 1986; SARTORI; GUARDIEIRO; SURJUS, 2013) e a produção de hormônios esteroides pelo folículo e CL (SPICER; ECHTERNKAMP, 1995).

A concentração circulante de insulina depende de vários fatores: estado energético (ADAMIAK et al., 2005), nível de alimentação (ADAMIAK et al., 2005; BENDER et al., 2014; GONG et al., 2002b; MATTOS, 2012; SALES et al., 2015; SURJUS, 2012; YAAKUB et al., 1999), forma de processamento do alimento (MORIEL et al., 2008), raça (SARTORI et al., 2016; SALES et al., 2015) e ingredientes da dieta (GARNSWORTHY et al., 2009). Nos trabalhos que envolvem insulina, dieta e reprodução, o que se tem feito é comparar a influência da “alta vs. baixa concentração de insulina circulante”. Não há, até o momento, estudos que estabeleçam patamares de concentrações de insulina circulante que sejam mais eficientes para as respostas de fertilidade das diversas categorias de fêmeas bovinas que se encontram em idade reprodutiva, fazendo com que a relação entre insulina e reprodução seja, ainda, imensamente complexa por conta dos inúmeros fatores que influenciam essa relação.

O que se sabe é que dietas chamadas restritivas, ou seja, que fazem a fêmea perder peso consideravelmente, trazem diversas consequências à reprodução (DISKIN et al., 2003; SELK et al., 1988), a não ser quando utilizadas estrategicamente (PARR et al., 2015). Da mesma forma, dietas com altos níveis de energia e alta ingestão (YAAKUB et al., 1999), principalmente em animais sobrepeso (ADAMIAK, et al., 2005) ou que recebem a dieta por tempo prolongado (SALES et al., 2015) também causam efeitos deletérios na reprodução. Em outras palavras, tem-se estabelecido que os extremos causam (geralmente) prejuízos às respostas de fertilidade, provavelmente não só pelo excesso ou falta de insulina, mas por todo cenário gerado por metabólitos e outros hormônios.

Diferente do que descrevem Yaakub et al. (1999), que forneceram por 100 dias suplemento à base de cevada vs. polpa cítrica e polpa de beterraba, o presente estudo não encontrou diferença na qualidade dos embriões produzidos (Tabelas 7 e 8). Enquanto que a média de embriões congeláveis no estudo de Yaakub e colaboradores foi de $1,3 \pm 0,3$ vs. $2,4 \pm 0,5$ ($P < 0,05$) para os grupos cevada vs. polpas, respectivamente, em nosso estudo foi obtido para milho e polpa cítrica $2,7 \pm 0,6$ vs. $3,6 \pm 0,8$ ($P = 0,70$; Tabela 8) embriões,

respectivamente. Quanto aos embriões viáveis, o estudo de Yaakub et al. (1999) obteve, para cevada vs. polpas, $2,9 \pm 0,5$ e $4,8 \pm 0,7$ ($P < 0,05$) embriões. Em nosso estudo foi obtido $3,6 \pm 0,9$ vs. $4,1 \pm 0,9$ ($P = 0,70$; Tabela 8) embriões para milho e polpa cítrica, respectivamente. A categoria animal utilizada foi diferente entre os estudos (novilhas no trabalho de Yaakub e colaboradores e vacas não lactantes no presente estudo), mas com necessidades metabólicas semelhantes.

É importante constatar que o presente estudo foi delineado em crossover. Sendo assim, vacas que são boas doadoras (ou não) de embriões fizeram parte dos dois tratamentos. Além disso, o estudo ocorreu durante o período de inverno e primavera a fim de evitar os efeitos adversos do estresse térmico na reprodução. Outro ponto positivo do estudo foi o número de animais utilizados, 22, que através do delineamento em reversão do tipo crossover e do número de SOVs em cada uma das réplicas (totalizando quatro SOVs por unidade experimental) permitiu um n final expressivo: 88 superovulações e colheitas de embrião.

Esse estudo utilizou vacas não lactantes e não gestantes e, portanto, foi possível fornecer aos animais dieta de manutenção para obter diferenças nas concentrações circulantes de insulina, evitando assim os efeitos dos chamados extremos (restrição ou alto consumo) e até mesmo os efeitos fisiológicos relacionados à gestação, parto e lactação. Ou seja, não havia fornecimento de alimento/insulina em excesso, assim como também não havia, por parte dos animais, grandes exigências. Nos estudos em que foram observados efeitos negativos da alta insulina na produção embrionária e nas respostas superovulatória e superestimulatória (ADAMIAK et al., 2005; MOLLO, 2007; SURJUS, 2013; YAAKUB et al., 1999), as fêmeas foram superalimentadas. Assim, o efeito negativo parece estar relacionado com a hiperinsulinemia associada à superalimentação.

A resposta superestimulatória (% de folículos existentes no dia da administração do primeiro FSH que foram estimulados e continuaram crescendo) foi maior na segunda SOV de cada período (aos 70 dias; Tabela 8), mas não houve diferença no número de CLs e de estruturas totais colhidas. No entanto, as colheitas realizadas aos 35 dias, independente de tratamento, proporcionaram resultados de fecundação e qualidade embrionária superiores: houve maior proporção de embriões viáveis e congeláveis dentre o total de estruturas colhidas e dentre as estruturas fecundadas. As SOVs realizadas aos 70 dias apresentaram menor taxa de fecundação e, conseqüentemente, maior número de estruturas não fecundadas (Tabela 8). Foi possível observar também que a taxa de ovulação ao protocolo de pré-sincronização realizado antes da primeira SOV de cada período foi maior comparada à taxa de ovulação da pré-sincronização realizada antes da segunda SOV de cada período (Tabela 5). Essa diferença

se deve, provavelmente, ao fato de que duas doses de $\text{PGF}_2\alpha$ possam não ter sido suficientes para causar luteólise completa e baixar a P_4 oriunda dos CLs provenientes da SOV anterior, comprometendo, dessa forma, a ovulação natural em várias vacas (MONTEIRO et al., 2015). Isso criou um quadro endócrino distinto e, provavelmente, menos adequado durante a segunda SOV de cada período. Por alguma razão não explicada, pode ter havido também comprometimento do transporte de oócitos e espermatozoides no útero ou oviduto (HUNTER, 2005) nas vacas da segunda SOV de cada período.

A técnica de dupla lavagem uterina descrita por Castro Neto et al. (2005) foi eficiente em aumentar a recuperação de embriões e oócitos: 31,2% do total de estruturas obtidas no estudo foi durante a segunda lavagem (Tabela 6), corroborando os dados de Castro Neto et al. (2005). O número de embriões transferíveis que podem ser recuperados na segunda lavagem, em torno de 50% do total obtido na primeira lavagem (Tabela 6), maximiza o uso da biotécnica de superovulação. Perante o custo total de mão de obra e protocolo de superovulação, o uso de solução de lavagem adicional representa uma parcela insignificante do custo total do processo.

Teste de tolerância à glicose

A resistência à insulina é definida como um estado em que uma concentração normal de insulina induz uma resposta biológica diminuída nos tecidos insulino-dependentes (DE KOSTER et al., 2015). Ela ocorre em vacas no período pós-parto imediato (BELL; BAUMAN, 1997), em vacas leiteiras no pós-parto ingerindo quantidades insuficientes de energia e apresentando altas concentrações circulantes de AGNEs (PIRES; PESCARA; GRUMMER, 2007), em vacas lactantes ou não recebendo dieta altamente energética sem a suplementação de propionato de cromo (LEIVA et al., 2013, 2014, 2015), com o avançar da lactação (aos 150 dias em leite; OLIVEIRA et al., 2016), após ingestão prolongada de dietas de alta energia por vacas não lactantes (SALES et al., 2015), em vacas gestantes e não lactantes sobrepeso (DE KOSTER et al., 2015) e após o tratamento com glicocorticoides (HACKBART et al., 2013).

Nesse estudo, a glicose infundida nas vacas do grupo milho foi removida mais rapidamente da circulação sanguínea (Figura 6), visto que a taxa de decaimento foi maior (maior percentagem da glicose desapareceu por minuto) e que o tempo de meia vida foi menor (a glicose permaneceu menos tempo na circulação sanguínea; Tabela 9) nesse grupo. O resultado disso foi uma menor área sob a curva de glicose entre os momentos 5 e 120 minutos após o término da infusão no grupo milho (Tabela 9).

Embora tenha havido diferença nos perfis de glicose entre os tratamentos, nenhum deles evidencia estado de resistência à insulina. De fato, ao se dividir o Δ Máx da insulina (μ UI/mL) multiplicado por 100 mL/dL pelo Δ Máx da glicose (mg/dL), obtiveram-se valores similares ($93,0 \pm 19,0$ vs. $105,2 \pm 16,0$ μ UI de insulina secretada por mg de aumento de glicose; $P = 0.64$) para os grupos milho e polpa cítrica respectivamente, sugerindo similar sensibilidade à insulina.

O HOMA-IR (*Homeostasis model assessment of insulin resistance*) é um índice desenvolvido pela medicina humana e utilizado para prever a resistência à insulina de tecidos periféricos tanto em mulheres como em animais, a partir de uma única colheita de sangue após um período de jejum (DE KOSTER; OPSOMER, 2013). Neste estudo, o HOMA-IR foi maior para vacas do grupo milho (Tabela 3), o que teoricamente atribuiria a elas uma maior resistência à insulina (através desse índice não há limites para dizer se a vaca é ou não resistente à insulina; apenas comparam-se os grupos e as vacas que possuem maior índice, são mais resistentes à insulina). No entanto, o perfil de glicose e insulina apresentado por ambos os grupos desse estudo não configura cenário de resistência à insulina. A glicose foi maior no grupo milho, mas a insulina secretada foi efetiva em retirá-la da circulação sanguínea. Ou seja, diferentes dietas que proporcionam alterações nas concentrações circulantes basais de glicose e insulina não induziram respostas diferentes a ponto de caracterizar um dos grupos como “mais resistente à insulina”, apesar da diferença obtida no valor de HOMA-IR (Tabela 3) e da alta correlação existente entre HOMA-IR e o pico de insulina (Figura 8).

A razão fisiológica do por quê vacas do grupo polpa cítrica terem apresentado maior glicose basal um dia antes da colheita de embriões também não foi compreendida. Segundo Butler (2003) a glicose circulante é influenciada positivamente pelo consumo de energia. Mas no presente estudo o nível de energia da dieta foi balanceado entre os tratamentos e a IMS não apresentou diferença, bem como não houve diferença na variação de peso. Não era esperado encontrar diferença na glicose pelo fato de o ruminante conseguir manter a glicose circulante bastante estável (BAUMAN; CURRIE, 1980).

7 CONCLUSÕES

Dietas de manutenção contendo aproximadamente 65% da MS composta por milho ou polpa cítrica produziram perfis metabólicos diferentes em vacas holandesas não lactantes e não gestantes: dieta milho proporcionou maior insulina e menor glicose basal circulante, no entanto, apresentou maior incremento de P4 circulante no período pós-prandial.

Alimentação de vacas holandesas não gestantes e não lactantes com dieta de manutenção à base de milho, que proporciona insulina basal média de 15 $\mu\text{UI/mL}$, não prejudicou a resposta superestimulatória, superovulatória ou a qualidade e quantidade de embriões produzidos quando comparado às vacas com 11 $\mu\text{UI/mL}$ de insulina basal circulante que receberam dieta de manutenção à base de polpa cítrica.

A P4 circulante no dia 6 após SOV aumentou no período pós-prandial de vacas holandesas não lactantes e não gestantes que receberam dieta de manutenção fornecida em duas frações diárias. O incremento da P4 circulante foi ainda maior quando a dieta fornecida era à base de milho.

Vacas apresentando insulina basal circulante de 15 vs. 11 $\mu\text{UI/mL}$ não apresentaram diferença na expressão gênica das enzimas hepáticas pertencentes ao citocromo P450 (2C19 e 3A4) ou aldoketo redutases (1D1 e 1C4), responsáveis pela metabolização de P4.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante ressaltar que esse estudo foi delineado levando em consideração pontos significantes da fisiologia da fêmea bovina. O fato de terem sido usadas vacas não gestantes e não lactantes permitiu que fossem avaliados os efeitos da dieta e da insulina nas variáveis relacionadas à reprodução sem a influência das alterações fisiológicas ocasionadas pela gestação ou lactação, visto que fêmeas nessas condições possuem partição de nutrientes significativamente diferente bem como necessidades energéticas superiores. Infelizmente não foi avaliado nesse estudo mas, dados de prenhez das transferências dos embriões colhidos dariam uma ideia mais abrangente do efeito da insulina na qualidade embrionária.

O delineamento desse estudo (em reversão, do tipo crossover) foi positivo, levando em consideração a grande divergência entre os resultados obtidos por diferentes fêmeas em se tratando da produção de embriões. Dessa forma, ambos os tratamentos foram representados pelos mesmos animais. Além disso, o delineamento incluiu duas SOVs em cada réplica. Como foram realizadas duas réplicas e utilizadas 22 vacas, o resultado foi um n expressivo: dados de 88 SOVs fizeram parte da análise dos resultados desse estudo, elevando o poder da análise dos dados. Além disso, conseguiu-se evitar que o efeito de estresse térmico comprometesse os resultados, já que o estudo foi conduzido no inverno e primavera.

Esse estudo se diferenciou dos demais que avaliaram a metabolização de P4 pelo fato de a fonte de P4 ser oriunda de CLs. Embora não seja possível controlar a concentração de P4 dessa forma, essa metodologia permitiu constatar um possível efeito da insulina na esteroidogênese luteal no momento pós-prandial, algo que a partir da utilização de implantes ou administração de P4 injetável não seria possível detectar. Além disso, a dieta de manutenção evitou que houvesse o efeito da alta IMS no fluxo sanguíneo hepático, diferenciando esse estudo dos demais, já que a concentração de P4 pós-prandial aumentou.

A formulação da dieta, que incluiu altos níveis de polpa cítrica ou milho, também foi positiva, uma vez que permitiu que fosse obtida diferença na concentração basal de insulina.

Para facilitar o entendimento do comportamento da insulina e P4 pós-prandial, colheitas de sangue seriadas, ao longo de um dia, deveriam ter sido realizadas.

Por fim, sugere-se experimentos cuja metodologia envolva diferentes dietas (a exemplo do presente estudo) e tratamentos que diferem na fonte de P4 (CL vs. implante intravaginal) resultando num fatorial 2x2, aliado às técnicas moleculares que avaliem a esteroidogênese luteal e a metabolização (pós-transcricional) de P4 pelo fígado. Assim, a

compreensão das diferenças entre resultados obtidos nos estudos que envolvem insulina e P4 bem como a compreensão dos resultados obtidos por esse estudo seria facilitada.

REFERÊNCIAS

- ADAMIAK, S.J.; MACKIE, K.; WATT, R.G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 73, p. 918-926, 2005.
- ARMSTRONG, D.G.; MCEVOY, T.G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J.J.; HOGG, C.O.; WOAD, K.J.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 64, p. 1624-1632, 2001.
- BAIRD, G.D.; LOMAX, M.A.; SYMONDS, H.W.; SHAW, S.R. Net hepatic and splanchnic metabolism of lactate, pyruvate and propionate in dairy cows in vivo in relation to lactation and nutrient supply. **Biochemical Journal**, London, v. 186, p. 47-57, 1980.
- BAITHALU, R.K.; SINGH, S.K.; GUPTA, C.; RAJA, A.K.; SAXENA, A.; AGARWAL, S.K. Insulin stimulates progesterone secretion to a greater extent than LH in early pregnant buffalo luteal cells cultured in vitro. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 142, p. 131-136, 2013.
- BALLARD, F.J.; HANSON, R.W.; KRONFELD, D.S. Gluconeogenesis and lipogenesis in tissue from ruminant and nonruminant animals. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 28, p. 218-231, 1969.
- BAMPIDIS, V.A.; ROBINSON, P.H. Citrus by-products as ruminant feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 128, p. 175-217, 2006.
- BASSETT, J.M. Diurnal patterns of plasma insulin, growth hormone, corticosteroid and metabolite concentrations in fed and fasted sheep. **Australian Journal of Biological Science**, Clayton, v. 27, n. 2, p. 167-181, 1974.
- BASTOS, M.R.; RAMOS, A.F.; DRIESSEN, K.; MARTINS, A.C.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Influência da alta ingestão de matéria seca na resposta superovulatória em vacas mestiças. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 4, p. 1066-1073, 2009.
- BAUMAN, D.E.; CURRIE, W.B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, 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**, Champaign, v. 81, p. 121-131, 1998.
- BELL, A.W.; BAUMAN, D.E. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. **Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia**, New York, v. 2, n. 3, p. 265-278, 1997.
- BENDER, R.W.; HACKBART, K. S.; DRESCH, A.R.; CARVALHO, P.D.; VIEIRA, L.M.; CRUMP, P.M.; GUENTHER, J.N.; FRICKE, P.M.; SHAVER, R.D.; COMBS, D.K.; WILTBANK, M.C. Effects of acute feed restriction combined with targeted use of increasing

luteinizing hormone content of follicle-stimulating hormone preparations on ovarian superstimulation, fertilization, and embryo quality in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 764-778, 2014.

BEN-GHEDALIA, D.; YOSEF, E.; MIRON, J.; EST, Y. The effects of starch- and pectin-rich diets on quantitative aspects of digestion in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 24, p. 289–298, 1989.

BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 70, p. 567-590, 1990.

BIDSTRUP, T.B.; BJORNSDOTTIR, I.; SIDELMANN, U.G.; THOMSEN, M.S.; HANSEN, K.T. CYP2C8 and CYP3A4 are the principle enzymes involved in the human in vitro biotransformation of the insulin secretagogue repaglinide. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Chichester, v. 56, p. 305-314, 2003.

BISINOTTO, R.S.; RIBEIRO, E.S.; LIMA, F.S.; MARTINEZ, N.; GRECO, L.F.; BARBOSA, L.F.S.P.; BUENO, P.P.; SCAGION, L.F.S.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Targeted progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, p. 2214-2225, 2013.

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

BOSSIS, I.; WETTEMANN, R.P.; WELTY, S.D.; VIZCARRA, J.; SPICER, L.J. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. **Biology of reproduction**, Madison, v. 62, p. 1436-1444, 2000.

BOWALGAHA, K.; ELLIOT, D.J.; MACKENZIE, P.I.; KNIGHTS, K.M.; MINERS, J.O. The glucuronidation of Δ^4 -3-keto C19- and C21-hydroxysteroids by human liver microsomal and recombinant UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): 6 α and 21 hydroxyprogesterone are selective substrates for UGT2B7. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 35, p.363-370, 2007.

BROCKMAN, R.P.; LAARVELD, B. Effects of insulin on net hepatic metabolism of acetate and β -hydroxybutyrate in sheep (*Ovis aries*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Philadelphia, v. 81, p. 255-257, 1985.

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

BRODERICK, G.A.; MERTENS, D.R.; SIMONS, R. Efficacy of carbohydrate sources for milk production by cows fed diets based on alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 1767-1779, 2002.

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

- BUTLER, W.R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 83, p. 211–218, 2003.
- BUTLER, W.R.; SMITH, R.D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, p. 767–783, 1989.
- CARVALHO, P.D.; SOUZA, A.H.; AMUNDSON, M.C.; HACKBART, K.S.; FUENZALIDA, M.J.; HERLIHY, M.M.; AYRES, H.; DRESCH, A.R.; VIEIRA, L.M.; GUENTHER, J.N.; GRUMMER, R.R.; FRICKE, P.M.; SHAVER, R.D.; WILTBANK, M.C. Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 3666-3683, 2014.
- CASTRO NETO, A.S.; SANCHES, B.V.; BINELLI, M.; SENEDA, M.M.; PERRI, S.H.; GARCIA, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 63, p. 1249-1255, 2005.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 162, p. 156-159, 1987.
- CLEMENTE, M.; DE LA FUENTE, J.; FAIR, T.; AL NAIB, A.; GUTIERREZ-ADAN, A.; ROCHE, J.F.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, Bristol, v. 138, p. 507–517, 2009.
- COOKE, R.F.; CAPPELLOZZA, B.I.; REIS, M.M.; BOHNERT, D.W.; VASCONCELOS, J.L.M. Plasma progesterone concentration in beef heifers receiving exogenous glucose, insulin, or bovine somatotropin. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, p. 3266-3273, 2012.
- CUMMINS, S.B.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O.; BERRY, D.P.; EVANS, R.D.; BUTLER, S.T. Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: I. Production characteristics and reproductive efficiency in a pasture-based system. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, p. 1310-1322, 2012.
- DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; ZALESKY, D.D.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Effects of restriction of dietary energy intake during the prepubertal period on secretion of luteinizing hormone and responsiveness of the pituitary to luteinizing hormone-releasing hormone in heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 62, p. 1641-1648, 1986.
- DE JONG, A. Patterns of plasma concentration of insulin and glucagon after intravascular and intraruminal administration of volatile fatty acids in the goat. **Journal of Endocrinology**, Colchester, v. 92, p. 357-370, 1982.
- DE KOSTER, J.D.; OPSOMER, G. Insulin resistance in dairy cow. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Maryland Heights, v. 29, p. 299-322, 2013.

DE KOSTER, J.D.; HOSTENS, M.; VAN EETVELDE, M.; HERMANS, K.; MOERMAN, S.; BOGAERT, H.; DEPREESTER, E.; VAN DEN BROECK, W.; OPSOMER, G. Insulin response of the glucose and fatty acid metabolism in dry dairy cows across a range of body condition scores. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, p. 4580-4592, 2015.

DEFRONZO, R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **The Medical Clinics of North America**, Maryland Heights, v. 88, p. 787-835, 2004.

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

DRACKLEY, J.K.; OVERTON, T.R.; DOUGLAS, G.N. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 100-112, 2001.

DUNAIF, A.; SEGAL, K.R.; FUTTERWEIT, W.; DOBRJANSKY, A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. **Diabetes**, Alexandria, v. 38, p. 1165-1174, 1989.

ECHTERNKAMP, S.E.; HOWARD, H.J.; ROBERTS, A.J.; GRIZZLE, J.; WISE, T. Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growthfactor- I, and insulin-like growth-factor binding-proteins in ovarian follicular-fluid of beef-cattle. **Biology of reproduction**, Madison, v. 51, p. 971-981, 1994.

FERGUSON, J.D.; GALLIGAN, D.T.; THOMSEN, N. Principal descriptors of body condition score in Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, p. 2695-2703, 1994.

FLOWERS, B.; MARTIN, M.J.; CANTLEY, T.C.; DAY, B.N. Endocrine changes associated with dietary-induced increase in ovulation rate (flushing) in gilts. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, p. 771-778, 1989.

FRÖJDÖ, S.; VIDAL, H.; PIROLA, L. Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: A review of the current evidence from humans. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1792, p. 83-92, 2009.

GAO, Z.; ZHANG, X.; ZUBERI, A.; HWANG, D.; QUON, M.J.; LEFEVRE, M.; YE, J. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 18, p. 2024-2034, 2004.

GARNSWORTHY, P.C.; FOULADI-NASHTA, A.A.; MANN, G.E.; SINCLAIR, K.D.; WEBB, R. Effect of dietary-induced changes in plasma insulin concentrations during the early postpartum period on pregnancy rate in dairy cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 137, p. 759-768. 2009.

GIMENES, L.U.; FERRAZ, M.L.; FANTINATO-NETO, P.; CHIARATTI, M.R.; MESQUITA, L.G.; SÁ FILHO, M.F.; MEIRELLES, F.V.; TRINCA, L.A.; RENNO, F. P.; WATANABE, Y.F.; BARUSELLI, P.S. The interval between the emergence of

pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect in vitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. **Theriogenology**, v. 83, p. 385-393, 2015.

GONG, J.G.; MCBRIDE, D.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotropin, insulin-like growth factor-1 and insulin on the proliferation of bovine granulosa cell in vitro. **Journal of Endocrinology**, Colchester, v. 139, p. 67-75, 1993.

GONG, J.G.; BAXTER, G.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 110, p. 91-97, 1997.

GONG, J.G.; LEE, W.J.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, p. 419-427. 2002a.

GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G.; BAXTER, G.; HOGG, C.O.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 57, p. 1591-1602, 2002b.

GRODSKY, G. M.; BENNETT, L.L. Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas. **Diabetes**, Alexandria, v. 15, p. 910-913, 1966.

GUTIERREZ, C.G.; OLDHAM, J.; BRAMLEY, T.A.; GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; WEBB, R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, p. 1876-1884, 1997.

HACKBART, K.S.; CUNHA, P.M.; MEYER, R.K.; WILTBANK, M.C. Effect of Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance on Follicle Development and Ovulation. **Biology of reproduction**, Madison, v. 88, p. 1-12, 2013.

HALL, M.B.; PELL, A.N.; CHASE, L.E. Characteristics of neutral detergent-soluble fiber fermentation by mixed ruminal microbes. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 70, p. 23-39, 1998.

HANSON, R.W.; BALLARD, F.J. The relative significance of acetate and glucose as precursors for lipid synthesis in liver and adipose tissue from ruminants. **The Biochemical Journal**, London, v. 105, p. 529-536, 1967.

HARMON, D.L. Nutritional regulation of postruminal digestive enzymes in ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 2102-2105, 1993.

HARRISON, R.O.; FORD, S.P.; YOUNG, J.W.; CONLEY, A.J.; FREEMAN, A.E. Increased milk production versus reproductive and energy status of high producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, p. 2749-2758, 1990.

HARRISON, L.M.; RENDEL, R.D. Influence of insulin and energy intake on ovulation rate, luteinizing hormone and progesterone in beef heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 63, p. 1228-1234. 1986.

HATFIELD, R.D.; WEIMER, P.J. Degradation characteristics of isolated and in situ cell wall lucerne pectic polysaccharides by mixed ruminal microbes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 69, p. 185–196, 1995.

HEDESKOV, C.J. Mechanism of Glucose-Induced Insulin Secretion. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 60, p. 442-509, 1980.

HENQUIN, J.C.; NENQUIN, M.; RAVIER, M.A.; SZOLLOSI, A. Shortcomings of current models of glucose-induced insulin Secretion. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, Chichester v. 11, p. 168–179, 2009.

HOCQUETTE, J.; ABE, H. Facilitative glucose transporters in livestock species. **Reproduction, Nutrition, Development**, Parc d'Activites de Courtaboeuf, v. 40, p. 517-533, 2000.

HORINO, M.; MACHLIN, L.J.; HERTELENDY, F.; KIPNIS, D.M. Effect of short-chain fatty acids on plasma insulin in ruminant and nonruminant species. **Endocrinology**, Chavy Chase, v. 83, p. 118-128, 1968.

HUNTER, R.H.F. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? **Reproduction, Nutrition and Development**, Parc d'Activites de Courtaboeuf, v. 45, p. 281-290, 2005.

KAHN, C.R. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. **Metabolism**, Maryland Heights, v. 27, p. 1893-1902, 1978.

KAHN, B.B.; FLIER, J.S. Obesity and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, West Sussex, v. 106, p. 473-481, 2000.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2011. 212 p.

LACY, P.E. Electron microscopy of the beta cell of the pancreas. **American Journal of Medicine**, New York, v. 31, p. 851-859, 1961.

LADENHEIM, R.G.; TESONE, M.; CHARREAU, E.H. Insulin action and characterization of insulin receptors in rat luteal cells. **Endocrinology**, Chavy Chase, v. 115, p. 752-756, 1984.

LANZAS, C.; SNIFFEN, C.J.; SEO, S.; TEDESCHI, L.O.; FOX, D.G. A revised CNCPS feed carbohydrate fractionation scheme for formulating rations for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 136, p. 167-190, 2007.

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 non-lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, p. 775–782, 2014.

LEIVA, T.; COOKE, R.F.; ABOIN, A.C.; SOARES, H.F.; BARBOSA, M.; MADUREIRA, A.M.L.; BORGES, M.A.F.; VASCONCELOS, J.L.M. Effects of propiogenic ingredients on serum concentration of insulin and progesterone in non-lactating cows. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 153, p. 165-172, 2013.

- 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**, Amsterdam, v. 180, p. 121-128, 2015.
- LEMLEY, C.O.; BUTLER, S.T.; BUTLER, W.R.; WILSON, M.E. Short communication: Insulin alters hepatic progesterone catabolic enzymes cytochrome P450 2C and 3A in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, p. 641-645, 2008.
- LEMLEY, C.O.; KOCH, J.M.; BLEMININGS, K.P.; WILSON, M.E. Alterations in progesterone catabolic enzymes, CYP2C and CYP3A, in hepatocytes challenged with insulin and glucagon. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 8, p. 39-46, 2009.
- LEMLEY, C.O.; WILSON, M.E. Effect of cytochrome P450 and aldo-keto reductase inhibitors on progesterone inactivation in primary bovine hepatic cell cultures. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 4613-4624, 2010.
- LEMLEY, C.O.; WILMOTH, T.A.; TAGER, L.R.; KRAUSE, K.M.; WILSON, M.E. Effect of a high cornstarch diet on hepatic cytochrome P450 2C and 3A activity and progesterone half-life in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 1012-1021, 2010.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, Maryland Heights, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOPEZ, H.; SATTER, L.D.; WILTBANK, M.C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 81, p. 209-223, 2004.
- LOPEZ, H.; CARAVIELLO, D.Z.; SATTER, L.D.; FRICKE, P.M.; WILTBANK, M.C. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 2783-2793, 2005.
- MANN, G.E.; LAMMING, G.E.; ROBINSON, R.S.; WATHES, D.C. The regulation of interferon- τ production and uterine hormone receptors during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 54, p. 317-328, 1998.
- MASHEK, D.G.; INGVARTSEN, K.L.; ANDERSEN, J.B.; VESTERGAARD, M.; LARSEN, T. Effects of a four-day hyperinsulin emiceuglycemic clamp in early and mid-lactation dairy cows on plasma concentrations of metabolites, hormones, and binding proteins. **Domestic Animal Endocrinology**, Philadelphia, v. 21, p. 169-185, 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 prepuberal gilts. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, p. 2081-2091, 1991.
- MATTOS, F.C.S.Z. **Influência da ingestão alimentar nas concentrações plasmáticas de insulina e progesterona e na expressão de enzimas hepáticas envolvidas no metabolismo de progesterona em ovelhas pré-púberes**. 2012. 78 p. Dissertação (Mestrado em

Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu, 2012.

MEADOWS, C.; RAJALA-SCHULTZ, P.J.; FRAZER, G.S. A spreadsheet- based model demonstrating the nonuniform economic effects of varying reproductive performance in Ohio dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 1244-1254, 2005.

MOLLO, M.R. **Função ovariana e produção de embriões em novilhas da raça Nelore submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar**. 2007. 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

MONTEIRO JR., P.L.J.; BORSATO, M.; SILVA, F.L.M.; PRATA, A.B.; WILTBANK, M. C. SARTORI, R. Increasing estradiol benzoate, pretreatment with gonadotropin-releasing hormone, and impediments for successful estradiol-based fixed-time artificial insemination protocols in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, p. 3826-3839, 2015.

MOORE, S.G.; SCULLY, S.; BROWNE, J.A.; FAIR, T.; BUTLER, S.T. Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: V. Factors affecting circulating progesterone concentrations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 5543-5557, 2014.

MORIEL, P.; SCATENA, T.S.; SÁ FILHO, O.G.; COOKE, R.F.; VASCONCELOS, J.L.M. Concentrations of Progesterone and Insulin in Serum of Nonlactating Dairy Cows in Response to Carbohydrate Source and Processing. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, p. 4616-4621, 2008.

MUNIYAPPA, R.; LEE, S.; CHEN, H.; QUON, M.J. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 294, p. 15-26, 2008.

MURPHY, M.G.; ENRIGHT, W.J.; CROWE, M.A.; MCCONNELL, K.; SPICER, L.J.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 92, p. 333-338, 1991.

MURRAY, M. Microsomal cytochrome p450-dependent Steroid metabolism in male sheep liver. Quantitative importance of 6 β -hydroxylation and evidence for the involvement of a P450 from the IIIa subfamily in the pathway. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 38, n. 5, p. 611-619, 1991.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; MCGUIRE, W.J.; BELFIORE, C.J.; WILTBANK, M. C. Luteal function: the estrous cycle and early-pregnancy. **Biology of reproduction**, Madison, v. 50, p. 239-247, 1994.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington: National Academy Press. 2001. 381 p.

NUSSEY, S; WHITEHEAD, S. **Endocrinology: an integrated approach**. Oxford: BIOS Scientific, 2001. 355 p.

O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P.; SPICER, L.J.; BOLAND, M.P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 118, p. 303-313, 2000.

OH, Y.K.; EUN, J.S.; LEE, S.C.; CHU, G.M.; LEE, S.S.; MOON, Y.H. Responses of blood glucose, insulin, glucagon, and fatty acids to intraruminal infusion of propionate in hanwoo. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Gawanak-gu, v. 28, p. 200-206, 2015.

OLIVEIRA, L.H.; NASCIMENTO, A.B.; MONTEIRO JR., P.L.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 small follicles. **Journal of Dairy Science**, Champaign, 2016. In press.

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

PARR, M.H.; CROWE, M.A.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O.; FAIR, T.; DISKIN, M.G. The concurrent and carry over effects of long term changes in energy intake before insemination on pregnancy per artificial insemination in heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 157, v. 87-94, 2015.

PENNING, T.M.; BURCZYNSKI, M.E.; JEZ, J.M.; HUNG, C.; LIN, H.; MA, H.; MOORE, M.; PALACKAL, N.; RATNAM, K. Human 3A-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. **Journal Biochemistry**, Preet Vihar, v. 351, p. 67-77, 2000.

PERRY, G. 2013 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newsletter**, Champaign, v. 33, p. 14-26, 2015.

PETHICK, D.W.; LINDSAY, D.B.; BARKER, P.J.; NORTHOP, A.J. Acetate supply and utilization by the tissues of sheep in vivo. **The British Journal of Nutrition**, Shaftesbury, v. 46, p. 97-110, 1981.

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

REECE, W.O. **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 926 p.

RIBEIRO, E.S.; GOMES, G.; GRECO, L.F.; CERRI, R.L.A.; VIEIRA-NETO, A.; MONTEIRO JR., P.L.J.; LIMA, F.S.; BISINOTTO, R.S.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, p. 1-20, 2016.

RICO, J.E.; BANDARU, V.V.R.; DORSKIND, J.M.; HAUGHEY, J.N.; MCFADDEN, J.W. Plasma ceramides are elevated in overweight Holstein dairy cows experiencing greater

lipolysis and insulin resistance during the transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, p. 7757-7770, 2002.

RIVERA, F.A.; MENDONÇA, L.G.D.; LOPES JR, G.; SANTOS, J.E.P.; PEREZ, R.V.; AMSTALDEN, M.; CORREA-CALDERÓN, A.; CHEBEL, R.C. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 141, p. 333–342. 2011.

ROBERTSON, I.; NELSON, R. Certification and identification of the embryo. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (Ed.). **Manual of the International Embryo Transfer Society**. Savoy: International Embryo Transfer Society, 1998. p. 103–116.

ROCHE, J.R.; KAY, J.K.; FRIGGENS, N.C.; LOOR, J.J.; BERRY, D.P. Assessing and managing body condition score for the prevention of metabolic disease in dairy cows. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Maryland Heights, v. 29, p. 323-336, 2013.

RODRIGUES, C.A.; TEIXEIRA, A.A.; FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; MANCILHA, R.F.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.118, p. 110-117, 2010.

SAGUNA, K.; MEHROTRA, S.; AGARWAL, S.K.; HOQUE, M.; SHANKER, U.; SINGH, S.K.; VARSHNEY, V.P. Effect of exogenous insulin administration on ovarian function, embryo/fetal development during pregnancy in goats. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 111, p. 202-213, 2009.

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

SALYERS, A.A. Energy sources of major intestinal anaerobes. **The American Journal of Clinic Nutrition**, Bethesda, v. 32, p. 158-163, 1979.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D.K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L.E.; WILTBANK, M.C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 2831-2842, 2002.

SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W.; CHEBEL, R.C.; CERRI, R.L.A.; GALVAO, K.N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82, p. 513-535, 2004.

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

SARAGÜETA, P.; KRIMER, A.R.D.; CHARREAU, E.H.; TESONE, M. Insulin regulation of steroidogenic activity in rat culture luteal cells. **The Journal of Steroid Biochemistry**, Kidlington, v. 32, p. 393-397, 1989.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S.A.; GUENTHER, J.N.; PARRISH, J.J.; WILTBANK, M.C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 2803-2812, 2002.

SARTORI, R.; SUAREZ-FERNANDEZ, C.A.; MONSON, R.L.; GUENTHER, J.N.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 60, p. 1319-1330, 2003.

SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D.Z.; GEIGER, L.; SCHENK, J.; WILTBANK, M.C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 1, p. 86-90, 2004.

SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M.M.; MOLLO, M.R.; SURJUS, R.S. Feed intake and reproduction in cattle. In: GARNSWORTHY, P.C.; WISEMAN, J. **Recent advances in animal nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2012. p. 21-36.

SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M.M.; SURJUS, R.S. Effects of dry matter or energy intake on embryo quality in cattle. **Cattle Practice**, Gloucestershire, v. 21, p. 50-54, 2013.

SARTORI, R.; GIMENES, L.U.; MONTEIRO JR., P.L.J.; MELO, L.F.; BARUSELLI, P.S.; BASTOS, M.R. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 86, p. 32-40, 2016.

SAUERWEIN, H.; MIYAMOTO, A.; GÜNTHER, J.; MEYER, H.H.D.; SCHAMS, D. Binding and action of insulin-like growth factors and insulin in bovine luteal tissue during the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 96, p. 103-115, 1992.

SEKAR, N.; GARMEY, J.C.; VELDHUIS, J.D. Mechanisms underlying the steroidogenic synergy of insulin and luteinizing hormone in porcine granulosa cells: joint amplification of pivotal sterol-regulatory genes encoding the low density lipoprotein (LDL) receptor, steroidogenic acute regulatory (stAR) protein and cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) enzyme. **Molecular and cellular endocrinology**, Shannon, v. 159, p. 25-35, 2000.

SELK, G.E.; WETTEMANN, R.P.; LUSBY, K.S.; OLTJEN, J.W.; MOBLEY, S.L.; RASBY, R.J.; GARMENDIA, J.C. Relationships among weight change, body condition and reproductive performance of range beef cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 66, p. 3153-3159. 1988.

SELVARAJU, S.; AGARWAL, S.K.; KARCHE, S.D.; MAJUMDAR, A.C. Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats treated with insulin. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 59, p. 1459-1468, 2003.

SILVA, J.M.; PRICE, C.A. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. **Journal of Endocrinology**, Colchester, v. 174, p. 499–507, 2002.

SIMPSON, R.B.; CHASE JR, C.C.; SPICER, L.J.; VERNON, R.K.; HAMMOND, A. C.; RAE, D.O. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 102, p. 483-492, 1994.

SMITH, D.L.; STINEFELT, B.M.; BLEMINGS, K.P.; WILSON, M.E. Diet-induced alterations in progesterone clearance appear to be mediated by insulin signaling in hepatocytes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 1102-1109. 2006.

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

SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, Philadelphia, v. 12, p. 223-245, 1995.

STEINER, D.F. Evidence for a precursor in the biosynthesis of insulin. **Transactions of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 30, p. 60-68, 1967.

SURJUS, R.S. **Produção de embriões e fisiologia ovariana em vacas Nelore sob diferentes níveis nutricionais**. 2013. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

VALERA MORA, M.E.; SCARFONE, A.; CALVANI, M.; GRECO, A.V.; MINGRONE, G. Insulin clearance in obesity. **Journal of the American College of Nutrition**, Clearwater, v. 22, p. 487–493, 2003.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2 ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476 p.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, p. 1-12, 2002.

VASCONCELOS, J.L.M.; SANGSRITAVONG, S.; TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 60, p. 795-807, 2003.

VIEIRA, F.V.R.; COOKE, R.F.; ABOIN, A.C.; LIMA, P.; VASCONCELOS, J.L.M. Short communication: acute but transient increase in serum insulin reduces messenger RNA

expression of hepatic enzymes associated with progesterone catabolism in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, p. 1085-1089, 2013.

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

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 59, p. 571-584. 2003.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 63-74, 2004.

WILD, R. A.; PAINTER, P. C.; COULSON, P. B.; CARRUTH, K. B.; RANNEY, G. B. Lipoprotein lipid concentrations and cardiovascular risk in women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Clinic Endocrinology and Metabolism**, Chevy Chase, v. 61, p. 946-951, 1985.

WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; BENDER, R. W.; NASCIMENTO, A. B. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 24, p. 238-243, 2012.

WRENZYCKI, C.; DE SOUSA, P.; OVERSTRÖM, E. W.; DUBY, R. T.; HERRMANN, D. WATSON, A. J.; NIEMANN, H.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M. P. Effects of superovulated heifer diet type and quantity on relative mRNA abundances and pyruvate metabolism in recovered embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 118, p. 303-313, 2000.

YAAKUB, H.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M. P. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 51, p. 1259-1266. 1999.

YELICH, J. V.; WETTEMANN, R. P.; MARSTON, T. T.; SPICER, L. J. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. **Domestic Animal Endocrinology**, Philadelphia, v. 13, n. 4, p. 325-338, 1996.

YUAN, J.S.; REED, A.; CHEN, F.; STEWART, C.N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**, London, v. 7, p. 85-96, 2006.

ZAROS, L. G.; BRICARELLO, P. A.; AMARANTE, A. F. T.; COUTINHO, L. L. Quantification of bovine cytokine gene expression using real-time RT-PCR methodology. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 575-579, 2007.