

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Utilização estratégica de insulina durante protocolos
de sincronização da ovulação em bovinos**

Andressa Stein Maffi

Pelotas, 2016

Andressa Stein Maffi

**Utilização estratégica de insulina durante protocolos de sincronização da
ovulação em bovinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Reprodução Animal e Transtornos Metabólicos).

Orientador: Marcio Nunes Corrêa

Coorientador(es): Cassio Cassal Brauner

Joabel Tonellotto dos Santos

Francisco Augusto Burket Del Pino

Viviane Rohig Rabassa

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M187u Maffi, Andressa Stein

Utilização estratégica de insulina durante protocolos de sincronização da ovulação em bovinos / Andressa Stein Maffi ; Marcio Nunes Corrêa, orientador ; Cassio Cassal Brauner, Joabel Tonellotto dos Santos, coorientadores. — Pelotas, 2016.

60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Diâmetro folicular. 2. Pós-parto. 3. Reprodução. 4. Vaca. I. Corrêa, Marcio Nunes, orient. II. Brauner, Cassio Cassal, coorient. III. Santos, Joabel Tonellotto dos, coorient. IV. Título.

CDD : 636.2

Elaborada por Maria Beatriz Vaggetti Vieira CRB: 10/1032

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Gallas Leivas (Unipampa, Curso de Medicina Veterinária)

Prof. Dr. Bernardo Gasperin (UFPEL, Faculdade de Veterinária)

Prof. Dr^a. Carolina Jacometo (UFPEL, Faculdade de Veterinária)

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa (Orientador, UFPEL, Faculdade de Veterinária)

Agradecimentos

À Deus pela vida, pelo dom de cuidar dos animais, pelo amparo nos momentos mais difíceis e por me acompanhar ao longo desta jornada.

Aos meus pais Euzébio e Lucilda, minhas irmãs Éverla e Amanda e minha avó Helga, pelo amor incondicional, apoio, e amparo. Vocês são essenciais em minha vida.

As meus amigos, pelo companheirismo e os momentos que passamos juntos. Vocês tornaram essa jornada mais alegre.

Ao meu orientador Dr. Marcio Nunes Côrrea e co-orientadores Dr. Cassio Cassal Brauner e Dr. Joabel Tonellotto dos Santos, pelos ensinamentos, confiança, oportunidades e por serem exemplos de profissionais.

A toda família NUPEEC, ao auxílio para realização desse trabalho, e ao crescimento pessoal e profissional que me proporcionaram.

A Granja 4 Irmãos S/A a empresa In Vitro Sul e a Cabanha Aguada pela disponibilidade dos animais que foram utilizados nas avaliações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Resumo

MAFFI, Andressa Stein. **Utilização de Insulina durante protocolos de sincronização da ovulação em bovinos**. 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A reprodução animal é um dos fatores de maior importância na bovinocultura e afeta diretamente a eficiência e a rentabilidade do sistema. O aumento das concentrações sanguíneas de NEFA e BHBA, enquanto as concentrações de IGF-I, glicose e insulina estão baixas, afeta o crescimento, maturação e ovulação do folículo dominante. O objetivo geral foi avaliar a utilização de insulina em protocolos de sincronização da ovulação em bovinos. Dois estudos foram realizados, o primeiro com objetivo de avaliar o efeito da utilização de insulina sobre o crescimento do folículo dominante, produção de estradiol e progesterona em vacas holandesas. Foram utilizadas vinte e uma vacas primíparas da raça Holandês, com média de 70 dias em lactação, mantidas em um sistema semi-extensivo. Os animais foram submetidos a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo que consistiu na aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol e a inserção de um dispositivo de liberação lenta de progesterona no dia 0. Aplicação de 12,5 mg de dinoprost no dia 8 e 5 mg de GnRH no dia 9 do protocolo. No dia 8, os animais foram divididos em grupo controle (GC; n 9) e grupo insulina (GI; n 12), que recebeu uma aplicação de 0,25 UI/kg de insulina. O segundo estudo, foi dividido em dois experimentos com objetivo de avaliar o efeito da utilização de insulina sobre o crescimento do folículo dominante, produção de progesterona e taxa de prenhez em vacas de corte. No experimento 1, 215 vacas *Bos Taurus* foram submetidas a um protocolo de IATF que consistiu na aplicação de 2 mg de BE e inserção de um dispositivo de liberação lenta de progesterona no dia 0. No dia 9 remoção do dispositivo de progesterona, a aplicação de 0,5 mg de cipionato de estradiol, 12,5 mg de dinoprost e divisão dos animais em GC 109 e GI 106, que recebeu a aplicação de 0,25 UI / kg de insulina. No experimento 2, foram usadas 85 vacas *Bos Taurus*, durante um protocolo de transferência de embriões. No dia 0 fez-se a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol e inserção de um dispositivo de liberação lenta de P₄. No 5º dia do protocolo, procedeu-se com a aplicação de 0,150 mg de d-Coprostenol. No 8º dia retirada da progesterona, aplicação de 20 mg de foltropina de pituitária suína e divisão dos animais em grupo controle (GC 49) e grupo insulina (GI 36) que recebeu a aplicação de 0,25 UI/ kg de insulina, no 9º dia aplicou-se 1 mg de benzoato de estradiol e no dia 17 do protocolo procedeu-se com a inovulação. No primeiro estudo, a aplicação de insulina não aumentou o diâmetro do folículo dominante produção de estradiol, área lútea e produção de P₄, porém os animais do GC apresentaram uma redução numérica da área lútea e dos níveis de P₄ da primeira para a segunda avaliação. No segundo estudo, a aplicação de insulina não aumentou o diâmetro do folículo dominante produção de P₄, e taxa de prenhez.

Palavras-Chave: Diâmetro Folicular, Pós-parto, Reprodução, Vaca .

Abstract

MAFFI, Andressa Stein. **Use of insulin during synchronization protocols of ovulation in cattle**. 2016. 60f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The animal reproduction is one of the major important factors in cattle and directly affects the efficiency and profitability of the system. The increase in blood concentrations of NEFA and BHBA, while IGF-I concentrations, glucose and insulin are low, affects the growth, maturation and ovulation of the dominant follicle. The overall aim was to evaluate the use of insulin in synchronization protocols of ovulation in cattle. Two studies were conducted, the first to evaluate the effect of the insulin on the growth of the dominant follicle, production of estradiol and progesterone. Twenty-one primiparous holstein cows were used, averaging 70 days in milk, maintained in a semi-extensive system. The animals were submitted to a fixed-time artificial insemination protocol which consisted of the application of 2 mg of estradiol benzoate and insertion of a slow release of progesterone device on day 0. Application of 12,5 mg of dinoprost on day 8 and 5 mg of GnRH on day 9 of the protocol. On day 8, the animals were divided into control group (GC, n 9) and insulin group (GI, n 12), which received an application of 0,25 IU / kg of insulin. The second study was divided into two experiments to evaluate the effect of the insulin on the growth of the dominant follicle, P4 and pregnancy rate in beef cows. In experiment 1, 215 *Bos taurus* cows were subjected to a fixed-time artificial insemination protocol which consisted of the application of 2 mg of estradiol benzoate and insertion of a slow release of progesterone device on day 0. On day 9 progesterone removal device, the application of 0,5 mg of estradiol cypionate, 12,5 mg of dinoprost and division of animals GC 109 and GI 106, which received application of 0,25 IU / kg insulin. In experiment 2, they were used 85 cows *Bos taurus*, for an embryo transfer protocol. On day 0 was made the application of 2 mg of estradiol benzoate and insertion of a slow release of progesterone device. On day 5 of the protocol, it proceeded with the application of 0.150 mg of d-Coprostenol. On the 8th day of removal progesterone application of 20 mg of porcine pituitary folltropin and division of animals in GC 49 and GI 36 which received application of 0,25 IU / kg insulin in the 9th day was applied 1 mg of estradiol benzoate and 17 of the protocol proceeded with embryo transfer. In the first study, the application of insulin did not increase the diameter of the dominant follicle, estradiol production, luteal area and production of P4, but the animals in the control group showed a numerical reduction of luteal area and P4 levels of the first to the second evaluation. In the second study, the application of insulin did not increase the diameter of the dominant follicle production P4, and pregnancy rate.

Keywords: Follicular diameter, Postpartum, Reproduction, Cow.

Lista de Abreviaturas

ARC- Núcleo Arqueado

ATP- Adenosina Trifosfato

BEN- Balanço Energético Negativo

BHBA- β -hidroxibutirato

CL- Corpo Lúteo

eCG- Gonadotrofina Coriônica Equina

FSH- Hormônio Folículo Estimulante

GH- Hormônio do crescimento

GnRH- Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

IATF- Inseminação Artificial em Tempo Fixo

IGF-I- Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

IMS- Ingestão de Matéria Seca

LH- Hormônio Luteinizante

LHR- Receptor do Hormônio Luteinizante

MAPK- Proteína Quinase Mitogenicamente Ativada

NEFA- Ácidos Graxos Não Esterificados

POA- Área Pré-Óptica

POMC- Pró-opiomelancortina

RNAm- RNA mensageiro

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Foliculogênese em bovinos.....	11
2.1.1 Fase Pré- antral	11
2.1.2 Fase Antral	12
2.2 Ação da insulina sobre o sistema reprodutivo de bovinos	13
3 HIPÓTESE e OBJETIVOS	17
3.1 Hipótese.....	17
3.2 Objetivo Geral	17
3.3 Objetivos Específicos	17
4 CAPÍTULOS	18
4.1 Manuscrito 1– Avaliação do crescimento folicular de vacas da raça holandês desafiadas metabolicamente e tratadas estrategicamente com insulina	18
4.2 Manuscrito 2 – Avaliação do crescimento folicular de vacas <i>Bos Taurus</i> tratadas estrategicamente com insulina.....	37
5 CONCLUSÃO GERAL.....	54
6 REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO GERAL

A reprodução animal constitui-se em um dos fatores de maior importância dentro da bovinocultura e afeta diretamente a eficiência e a rentabilidade do sistema (Hess et al., 2005). Em vacas leiteiras o Balanço Energético Negativo (BEN), é o fator chave relacionado à reduzida eficiência reprodutiva. Esse desequilíbrio energético ocorre devido o pico de produção de leite que se dá semanas antes ao pico da Ingestão da Matéria Seca (IMS), sendo que nas ultimas semanas pré-parto devido a fatores hormonais e anatômicos já se observa um decréscimo da IMS (Bauman & Currie, 1980, Hayirli et al., 2002), que só retorna aos níveis normais a partir da terceira semana pós-parto. Com isso, a energia necessária para manutenção e produção de leite é superior à capacidade de ingestão e absorção de energia através da alimentação, promovendo alterações metabólicas e ocasionando uma redução da eficiência reprodutiva (Butler & Smith, 1989). O BEN caracteriza-se metabolicamente pelo aumento das concentrações sanguíneas de NEFA e Beta-hidroxibutirato (BHBA), enquanto as concentrações de fator de crescimento semelhante à insulina- I (IGF-I), glicose e insulina estão baixas (Gutierrez et al., 2006). Leon et al., (2004) observaram uma relação direta entre perda de condição corporal e redução dos níveis circulantes de insulina, IGF-I e hormônio do crescimento (GH), sendo que a alteração nos níveis sanguíneos dessas substâncias está geralmente associada ao comprometimento da função ovariana e fertilidade (Leroy et al., 2005), pois ocasionam um decréscimo na liberação de hormônio luteinizante (LH) (Butler & Smith, 1989, Williams, 1990, DeRouen et al., 1994, Wiltbank et al., 2002) comprometendo o crescimento folicular e ovulação (Grimard et al., 1995).

Na bovinocultura de corte, a condição nutricional das vacas no pós-parto recente também esta associada à reduzida eficiência reprodutiva, devido principalmente à associação de baixa quantidade de reservas corporais e presença do terneiro. Como a lactação é um estado dominante sobre outras atividades fisiológicas, a vaca prioriza a produção de leite para o terneiro em relação à atividade reprodutiva (Short et al., 1990, Bauman, 2000). Além disso, a presença do terneiro libera hormônios opióides fazendo com que a frequência de liberação pulsátil de Hormônio Liberador das Gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo seja reduzida, ou até mesmo bloqueada (Williams, 1990) .

Uma das alternativas para minimizar o efeito do anestro pós-parto, reduzindo o intervalo parto concepção e os dias em aberto, é o emprego de biotecnologias reprodutivas que visam à sincronização da ovulação a partir de protocolos hormonais. O maior desafio ainda é encontrado quando essas biotécnicas são empregadas em animais com baixa condição corporal, devido à relação desse parâmetro com o diâmetro do folículo dominante. Em bovinos *Bos Taurus* segundo Pfeifer et al., (2009) folículos menores que 13 mm apresentam redução da taxa de prenhez e da produção de progesterona quando transformados em Corpo Lúteo (CL), e folículos menores que 11 mm ocasionam maiores perdas embrionários (Perry et al., 2005). Em bovinos leiteiros, sabe-se que a indução a ovulação de folículos < 11,5 mm, gera CL pequenos que secretam baixos níveis de progesterona (Vasconcelos et al., 2001) e vacas que ovularam folículos com 14mm tiveram melhores taxas de prenhez e maior produção de progesterona pelo CL (Vasconcelos et al., 2001, Colazo & Ambrose, 2015).

Com a finalidade de incrementar o diâmetro do folículo dominante no momento da ovulação, tem-se realizado estudos manipulando a duração do proestro, utilizando hormônios reprodutivos como Hormônio folículo estimulante (FSH), FSH/LH e Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) (Savio et al., 1993, Barruselli, 2004, Colazo & Ambrose, 2015). Porém, um ponto importante a ser ressaltado e estudado, é a participação de hormônios metabólicos no desenvolvimento folicular, com ênfase no folículo ovulatório, pois o desenvolvimento do folículo dominante depende, além de hormônios reprodutivos, da interação de fatores locais e fatores de crescimento circulantes (Gong et al., 1991). Neste sentido, a associação de insulina ao eCG durante protocolo de IATF em bovinos de corte da raça Angus com baixa condição corporal promoveu melhora da taxa de prenhez (Schneider et al., 2010) e o emprego de insulina em um protocolo de superovulação aumentou o diâmetro de folículos grandes (Simpson et al., 1994). Os benefícios da insulina no âmbito reprodutivo já são bem estudados *in vitro*, porém, ainda há poucas pesquisas realizadas *in vivo*, o que torna necessária a realização de mais estudos associando a utilização da insulina aplicada a protocolos de sincronização da ovulação em bovinos, podendo posteriormente elucidar mecanismos fisiológicos relacionados a reprodução animal e humana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Foliculogênese em bovinos

A foliculogênese é um evento iniciado na vida pré-natal dos bovinos e pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, começando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório (Van den Hurk & Zhao, 2005). O ovário dos mamíferos é constituído, ao nascimento, por milhares de folículos primordiais, os quais são considerados o *pool* de reserva dos folículos ovarianos, entretanto, mais de 99,9% destes folículos nunca atingem a ovulação, visto que a maioria morre por um processo fisiológico designado atresia folicular (Markstrom et al., 2002).

O processo de foliculogênese pode ser dividido nas fases pré-antral e antral, onde a regulação de cada fase é complexa e envolve fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, que controlam diversos processos (Silva & Price, 2000, Webb et al., 2003, Acosta & Miyamoto, 2004, Fortune et al., 2004).

2.1.1 Fase Pré- antral

As fêmeas bovinas nascem com uma reserva de folículos conhecidos como primordiais, que possuem uma única camada de células da granulosa com a forma pavimentosa e que permanecem quiescentes até seu recrutamento (Van den Hurk & Zhao, 2005). Durante a vida reprodutiva, apenas um pequeno número desses folículos são estimulados a crescer (Yang et al., 1998). A transição de folículo primordial até o diâmetro aproximado de 4 mm ocorre na ausência de gonadotrofinas, indicando ser coordenado por fatores intrafoliculares e metabólitos sanguíneos (Gong et al., 1996), sendo essa fase conhecida como recrutamento. Ao ser iniciado o processo de recrutamento, ocorre alteração da morfologia celular, gerando desenvolvimento do oócito, multiplicação e diferenciação celular (Bristol-Gould et al., 2006). O oócito passa a ser circundado por uma camada completa de células da granulosa de morfologia cúbica, e os folículos são denominados primários (Gougeon, 1996). Com o decorrer do crescimento começam a ser sintetizadas as proteínas que formarão a zona pelúcida (Lee, 2000), e as células da granulosa se multiplicam formando várias camadas entorno do oócito, passando a serem

chamados de folículos secundários. Posteriormente inicia-se a formação das células da teca externa e os folículos passam a ser sensíveis ao FSH (Van den Hurk & Zhao, 2005), passando para a fase antral.

O crescimento dos folículos ovarianos, de aproximadamente 0,3 para 3 e para 5 mm de diâmetro, leva em torno de 30 dias, mas o desenvolvimento subsequente é rápido, com taxas de crescimento de até 2 mm/dia em folículos antrais maiores (Lussier et al., 1987).

2.1.2 Fase Antral

Na fase antral, os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais, com o crescimento e a organização das células da granulosa em várias camadas, ocorrendo a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro. A partir deste estágio, o diâmetro folicular aumenta acentuadamente devido à multiplicação das células da granulosa, da teca e ao aumento do fluido antral (Driancourt, 2001). Nesta fase, os folículos passam a ser dependentes de hormônios hipofisários, sendo que até a fase de divergência folicular, o FSH apresenta-se como o principal hormônio para o crescimento, que ocorre em ondas sincronizadas (Adams et al., 1992, Fricke et al., 1997, Fortune et al., 2001). Em bovinos, os intervalos interovulatórios apresentam 2 ou 3 ondas foliculares sempre precedidas pelo aumento dos níveis de FSH (Sirois & Fortune, 1988, Adams et al., 1992).

A partir do diâmetro de 6 e 9 mm ocorre o processo de divergência em *Bos Indicus* e *Bos Taurus* respectivamente que é associado com um aumento na concentração folicular de estradiol (Gong et al., 1996, Roche, 1996, Mihm et al., 2000, Fortune et al., 2001), redução na dependência de FSH (Mihm et al., 2006) associado a um aumento na expressão do gene para o receptor de LH (Beg et al., 2001) nas células da granulosa. O aumento do nível de estradiol gerado pelo folículo dominante diminui a expressão e a estabilidade do gene que codifica a subunidade beta do FSH (Roche, 1996), com isso gerando uma diminuição dos níveis plasmáticos desse hormônio (Evans et al., 1997, Austin et al., 2001) e inibindo a capacidade esteroidogênica dos folículos subordinados, com consequente início do processo de atresia via apoptose (Ginther et al., 1996). Já o folículo dominante, com o aumento do diâmetro folicular passa a adquirir receptores funcionais de LH e consequentemente maior capacidade ovulatória (Sartori et al., 2001) sendo que a

expressão do RNAm do LHR mostrou-se correlacionada com o diâmetro folicular em células da granulosa (Sartorelli et al., 2005).

O último estágio do desenvolvimento do folículo é denominado de pré-ovulatório. Nesta fase o oócito é circundado pelas células do *cumulus*, as células da granulosa do folículo param de se multiplicar em resposta ao LH e se inicia o processo de luteinização. Ao atingir 10 mm o folículo dominante adquire capacidade ovulatória, porém é necessário uma dose maior de LH para induzir ovulação em comparação com folículos maiores (Martinez et al., 1999). A ovulação do complexo *cumulus*-oócito é induzida por um aumento da secreção de LH que culmina então no pico de LH necessário à ovulação (Kanitz et al., 2001) e requer condições endócrinas favoráveis.

Sabe-se que além da ação das gonadotrofinas, também se tornou evidente que fatores de crescimento produzidos localmente e hormônios metabólicos constituem moléculas estimuladoras e reguladoras chave para os folículos antrais, atuando por meio de mecanismos parácrinos e endócrinos (Fortune et al., 2004, Ginther et al., 2001, Webb et al., 2003). O controle sincronizado desse desenvolvimento se dá através do sistema neuroendócrino envolvendo o GnRH, a pituitária que armazena gonadotrofinas, LH e FSH, e os hormônios sexuais, incluindo esteroides sexuais e fatores peptídicos (Garnsworthy & Webb, 1999, Tena-Sempere & Huhtaniemi, 2003, Webb et al., 2004, Webb et al., 2007). O GnRH é sintetizado no hipotálamo na Área Pré-óptica (POA) e é responsável pela ativação do eixo gonadotrófico na puberdade, e sua manutenção ao longo da vida produtiva. Enquanto o controle metabólico está localizado no Núcleo Arqueado (ARC), e é influenciado por níveis circulantes de glicose, IGF-I e insulina.

2.2 Ação da insulina sobre o sistema reprodutivo de bovinos

A insulina é uma pequena proteína globular de cerca de 5,7 kDa, sintetizada e secretada pelas células β - pancreáticas (González & Silva, 2006) responsável pelo transporte da glicose da corrente sanguínea para o interior das células, estando envolvida na homeostase da glicose e no metabolismo. Esse hormônio desempenha um papel central no organismo, sendo um sinalizador do estado de energia para o sistema nervoso central (Ingvarsen & Andersen, 2000). O mecanismo de ação da

insulina se dá através da família de receptores de fatores de crescimento, os quais possuem atividade tirosina-quinase intrínseca (Carvalho et al., 2002) em diversos tecidos corporais, tais como fígado, músculos e ovário (Sasaki et al., 2002). Sua estrutura é composta por duas subunidades, a subunidade α que é extracelular e com domínio rico em cisteína e serve como sítio para ligação da insulina, e a subunidade β que possui um domínio transmembranário e um intracelular, o qual é responsável pela transmissão do sinal e contém um sítio de ligação Adenosina Trifosfato (ATP) e vários sítios tirosina de auto-fosforilação (Belfiore et al., 2009). Ao ser fosforilado, o receptor de insulina interage com uma série de proteínas intracelulares, desencadeando uma cascata complexa de reações de fosforilação e defosforilação (Cheatham et al., 1996).

A ligação da insulina ao seu receptor também ativa a proteína quinase mitogenicamente ativada (MAPK) através de fosforilação (Cheatham et al., 1996, White, 1996). A ativação dessa proteína desencadeia os efeitos de crescimento promovidos pela insulina (Lawrence et al., 2007).

Além de atuar no hipotálamo, interagindo com neurotransmissores envolvidos no mecanismo de controle da fome-saciedade (Volp et al., 2008), a insulina também desempenha um importante papel na sinalização reprodutiva tanto a nível hipotalâmico quanto gonadal, demonstrando sua ação neuroendócrina na reprodução (Werther et al., 1987). Pesquisas relatam presença de receptores de insulina no hipotálamo, (Havrankova et al., 1978, Van Houten et al., 1980) em neurônios que expressam o GnRH (Werther et al., 1987) e estudos genômicos sugerem que a eliminação seletiva de receptores de insulina em neurônios KISS1, neurônios que modificam a atividade neuronal de GnRH para iniciar a puberdade e manter a fertilidade, causou atraso da maturidade púbere em ratos (Qiu et al., 2013). Outras populações neuronais, no qual a insulina induz respostas excitatórias são os Pró-opiomelanocortina (POMC), responsáveis pela produção de peptídeos que desempenham ações sobre a ingestão de alimentos e atividade sexual (Qiu et al., 2014).

A ação da insulina a nível gonadal é demonstrada através de diversos trabalhos *in vitro* em diferentes espécies animais. Em bovinos são observadas ações em células da granulosa, da teca e na enzima aromatase, através do aumento da proliferação e taxa de diferenciação celular e atividade esteroidogênica (Poretsky et al., 1984, Poretsky et al., 1985, Spicer et al., 1993, el-Roeiy et al., 1993, Simpson et

al., 1994, el-Roeiy et al., 1994, Shimizu et al., 2008). Um estudo cultivando células da granulosa e da teca *in vitro*, de folículos de diferentes estágios de desenvolvimento, demonstrou expressão de receptores de insulina em todas as fases, com maior quantidade em folículos dominantes pré- ovulatórios (Shimizu et al., 2008). Além disso, o número de receptores para insulina foi aumentado com a adição de FSH (Shimizu et al., 2008). A adição de insulina aos meios de cultivo de células da granulosa promoveu aumento no número de células, na produção de progesterona e de estrogênio (Spicer et al., 1993), e quando associada com o FSH, incrementou a atividade da aromatase em folículos pequenos (2-4 mm) (Maio & Schomberg 1981, Amsterdam et al., 1988, Gutierrez et al., 1997, Bhatia & Price, 2001), sendo que doses elevadas de insulina promoveu estímulo independente da presença de FSH (Bhatia & Price, 2001). E a adição de insulina em meios de cultivo de células da teca, estimulou a produção de andrógenos (Bergh et al., 1993). As ações da insulina também foram testadas na produção *in vitro* de embriões (PIV), e sua adição ao meio de cultivo aumentou o número de células do embrião (18%), taxa de clivagem (6%), número de blastocistos (33%) e reduziu o número de células apoptóticas, demonstrando um potencial efeito mitogênico e antiapoptótico (Augustin, 2003). Byrne et al., (2002) também observaram uma diminuição significativa no índice apoptótico com o uso desse hormônio, porém não houve diferenças nas taxas de desenvolvimento embrionário e no número de células. Efeitos benéficos da insulina sobre o desenvolvimento de embriões bovino foram observados apenas quando o meio de cultura foi suplementado com glicose (Matsui et al., 1995). Como a ação da insulina está fortemente relacionada à presença de glicose no meio (Pantaleon et al., 1997), a ausência ou diferentes concentrações de glicose no meio pode ser uma das razões dos diferentes resultados em pesquisas com produção *in vitro* de embriões bovinos (Augustin, 2003).

Estudos realizados *in vivo* demonstram que a insulina é um fator importante para o sistema reprodutor, pois permite que o ovário recupere a atividade cíclica pós-parto. Gong et al., (2002) demonstraram que a oferta de dieta alto amido até os 50 dias pós-parto aumentou a circulação de insulina e incrementou o número de vacas cíclicas antes dos 50 dias pós parto, de 55% para 90%, sem alterar a produção de leite e o balanço de energia. A utilização de insulina em protocolos de indução a ciclicidade em búfalas em anestro exerceu efeito positivo sobre a retomada da atividade ovariana, apresentação de cio e taxa de ovulação (Gupta et

al., 2010). Em vacas no início da lactação, mostrou uma correlação positiva entre os níveis de insulina e níveis de estradiol, demonstrando a capacidade esteroidogênica deste hormônio (Argov et al., 2004). A atuação da insulina também pode ser observada a nível folicular. Argov et al., (2004) observaram uma relação entre o número de folículos grau 1 e 2 e os níveis circulantes desse hormônio. Garnsworthy et al., (2009) ofertando uma dieta alta insulina também observaram um aumento no número total de folículos com uma tendência a maior número de folículos de 5 mm. Ao avaliar seu efeito sobre o diâmetro folicular, a utilização desse hormônio em protocolo de superovulação em vacas Brahman e Angus não interferiu no tamanho dos folículos pequenos e médios, tendo um aumento do diâmetro dos folículos maiores, apenas em vacas da raça Brahman, os quais também apresentaram maiores níveis de estradiol (Simpson et al., 1994). Suas ações também se refletem no tamanho e qualidade do corpo lúteo e na taxa de prenhez. Vacas recebendo uma dieta de baixa energia e insulina via oral apresentaram maior quantidade e peso do corpo lúteo, quando comparado aos animais recebendo uma dieta de baixa energia sem insulina (Harrison & Randel, 1986). Quando associado insulina ao eCG durante protocolo de IATF em bovinos de corte da raça Angus houve uma melhora da taxa de prenhez em animais com baixo Escore de Condição Corporal (ECC) (Schneider et al., 2010).

A partir dos estudos relatados acima, assume-se que a insulina participa da retomada da atividade ovariana, desenvolvimento folicular, esteroidogênese, e desenvolvimento embrionário. Porém são necessários mais estudos *in vivo* investigando a atuação da insulina em vacas de diferentes raças, com diferentes condições metabólicas e a sua aplicabilidade em biotecnias reprodutiva

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A utilização de insulina incrementa o desenvolvimento final do folículo dominante, aumentando a área lútea e produção de progesterona.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar a utilização de insulina em protocolos de sincronização da ovulação em bovinos.

3.3 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da aplicação de insulina sobre o crescimento do folículo dominante, área lútea, produção de estradiol e progesterona em vacas leiteiras da raça holandês desafiadas metabolicamente.
- Avaliar o efeito da aplicação de insulina sobre o crescimento do folículo dominante, e taxa de prehez em bovinos de corte.
- Avaliar o efeito da aplicação de insulina sobre a produção de progesterona em bovinos em boa condição corporal

4 CAPÍTULOS

4.1 Manuscrito 1– Avaliação do crescimento folicular de vacas da raça holandês desafiadas metabolicamente e tratadas estrategicamente com insulina

Andressa Stein Maffi*, Joabel Tonellotto dos Santos*, Cassio Cassal Brauner*, Eduardo Gularte Xavier†, Marcio Nunes Corrêa*

*NUPEEC, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

†Granjas 4 Irmãos S/A, Rio Grande, RS, Brasil.

Manuscrito submetido à revista *Journal of animal Sciece*

Resumo

A privação de energia reduz a frequência de pulsos de hormônio luteinizante, prejudicando o crescimento, maturação folicular e a ovulação. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da utilização estratégica de insulina como um co-fator energético durante protocolo de IATF, sobre o crescimento folicular de vacas da raça holandês pós-parto, desafiadas metabolicamente. Foram utilizadas 21 vacas primíparas da raça holandês entre 2 e 3 anos de idade com aproximadamente 70 dias em lactação, manejados em um sistema semi-extensivo. No dia 0 do protocolo realizou-se a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol e inserção de um dispositivo de liberação lenta de progesterona. Aplicação de 12.5 mg de dinoprost no dia 8 e a aplicação de 2,5 mg de GnRH no dia 9 do protocolo. No 8º dia, os animais foram divididos entre grupo controle (GC=9 animais) e grupo insulina (GI=12) que recebeu a aplicação de 0,25 UI/kg de insulina. Avaliações do diâmetro folicular e coletas de sangue foram realizadas diariamente do dia 8 do protocolo até a ovulação e posteriormente 5 e 13 dias após ovulação para mensuração da área lútea. A partir das amostras de sangue foram analisados os níveis de estradiol, progesterona, glicose e Ácidos Graxos Não Esterificados. A taxa de crescimento diário, diâmetro do folículo ovulatório, e os níveis de estradiol, não diferiram entre os grupos. A área lútea 5 e 13 dias após a ovulação e os níveis de progesterona foram semelhantes entre os grupos, porém observou-se uma redução numérica desses parâmetros da primeira para a segunda avaliação no grupo controle equato o grupo insulina apresentou um aumento numérico. Com isso concluímos que a aplicação de uma única dose de insulina não foi capaz de incrementar o diâmetro do folículo, produção de estradiol, área lútea e produção de progesterona.

Palavras Chave. bovinos, diâmetro folicular, metabolismo, reprodução

313 **Introdução**

314 Nas últimas décadas a bovinocultura leiteira passou por uma intensa seleção genética
315 voltada a produção de leite, não sendo acompanhado pela seleção de parâmetros reprodutivos
316 (Butler, 1998). Estima-se que nas primeiras semanas pós- parto, 80 % das vacas leiteiras
317 atravessam um grande desafio metabólico devido às altas demandas de energia para lactação
318 (Nebel & McGilliard, 1993). Nesse período são encontrados altos níveis de β -Hidroxibutirato
319 (BHBA) e Ácidos Graxos Não Esterificados (NEFA) e baixos níveis de insulina e glicose, os
320 quais são sinalizadores negativos para a reprodução (Gutierrez et al., 2006).

321 Uma nova onda folicular se inicia entre 5-7 dias após o parto, em resposta a
322 concentrações plasmáticas de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) elevadas, e
323 independentemente do Balanço Energético Negativo (BEN) um folículo começa a crescer
324 (Butler et al., 2003). Entretanto, nem sempre este folículo produz estradiol (E₂) suficiente a
325 ponto de induzir uma onda pré-ovulatória de Hormônio Luteinizante (LH). Essa falha na
326 ovulação das primeiras ondas pós-parto tem sido relacionada com o momento mais acentuado
327 do BEN (Butler, 2000). A privação de energia reduz a frequência de pulsos de LH,
328 prejudicando assim o crescimento e maturação folicular e a ovulação (Butler & Smith, 1989,
329 Canfield et al., 1990, Beam & Butler, 1997, 1998, Silva et al., 2007), e com isso aumentando
330 os dias em aberto (Butler & Smith, 1989, Nebel & McGilliard, 1993, Snijders et al., 2001).

331 A fim de reduzir o intervalo parto/concepção e aumentar a eficiência reprodutiva,
332 têm-se disponíveis ferramentas de manejo como os protocolos de Inseminação Artificial em
333 Tempo Fixo (IATF). A IATF promove a sincronização da ovulação, permitindo a
334 inseminação artificial sem a necessidade de detecção do estro (Pursley et al., 1997). Porém as
335 taxas de gestação médias ao redor de 30% ainda apresentam um grande espaço para melhora.
336 Estudos têm apresentado uma importante relação entre o diâmetro do folículo ovulatório e o
337 sucesso reprodutivo durante protocolos de IATF (Vasconcelos et al., 2001, Vasconcelos et
338 al., 2013, Colazo & Ambrose, 2015). Folículos pré-ovulatórios com diâmetro reduzido

resultaram em menores concentrações de estradiol (E_2) no soro e função do corpo lúteo reduzida após a ovulação (Vasconcelos et al., 2009) com consequente redução das taxas de concepção (Bello et al., 2006).

O crescimento folicular em bovinos leiteiros é influenciado pelo déficit energético (Beam & Butler, 1999) e concentrações de insulina tem sido positivamente correlacionadas com o crescimento folicular (Beam & Butler, 1999, Gong et al., 2002), sendo um importante sinalizador da dinâmica folicular em bovinos (Webb et al., 2004). A associação de insulina ao eCG durante protocolo de IATF em bovinos de corte promoveu melhora da taxa de prenhez em animais com baixa condição nutricional comparado a animais que receberam apenas eCG (Schneider et al., 2010). Nossa hipótese é que a aplicação de insulina promove um maior crescimento final do folículo dominante, maior produção de E_2 , e consequente aumento da área lútea e secreção de progesterona (P_4). Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da utilização estratégica de insulina como um co-fator energético durante protocolo de IATF, sobre o crescimento folicular, produção de E_2 , tamanho da área lútea e secreção de P_4 , em vacas da raça holandês pós-parto.

Material e métodos

Animais

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo comitê de ética e experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas sob número 6773.

O trabalho foi realizado em uma propriedade leiteira localizada na cidade de Rio Grande-RS, distrito do Taim, nas coordenadas geográficas 32° 16 's, 52° 32', no período de agosto a setembro de 2015. Foram utilizadas 21 vacas primíparas da raça holandês, entre 2 e 3 anos de idade com aproximadamente 70 dias em lactação e produção média de 20 litros/dia. Os animais foram manejados em um sistema semi-extensivo sendo ordenhadas duas vezes ao dia e recebendo após cada ordenha uma dieta total.

364 Tratamento hormonal

365 Os animais selecionados passaram por uma avaliação ginecológica através de
366 palpação retal, para determinação da ciclicidade ovariana, além disso, fez-se a avaliação do
367 Escore de Condição Corporal (ECC) e posteriormente iniciou-se o protocolo de IATF. No dia
368 zero (D0) fez-se a inserção do dispositivo de liberação lenta de P4 contendo 1,9 g de P4,
369 CIDR[®] (Zoetis, São Paulo, Brasil) e a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol –, 1
370 mg/mL⁻¹, Gonadiol[®] (Zoetis, São Paulo, Brasil). No 8º dia do protocolo realizou-se a
371 aplicação 12,5 mg de dinoprost – i.m., 5 mg/ mL⁻¹, –, Lutalyse[®] (Zoetis, São Paulo, Brasil).
372 No 9º dia realizou-se a aplicação de 2,5 mg de GnRH- i.m., 2,5 mg/mL, Gestran[®] Plus–,
373 (Tecnopec, São Paulo, Brasil). No 8º dia do protocolo os animais foram divididos entre
374 grupo controle (GC=9 animais) e grupo insulina (GI=12 animais) considerando-se a
375 mensuração do diâmetro do folículo dominante, ECC, produção de leite e ciclicidade. Os
376 animais do GI receberam uma aplicação de 0,25 UI/kg de insulina Humana, Novolin[®] N
377 (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) via subcutânea (Figura 1).

378 Avaliação ultrassonográfica

379 A avaliação do diâmetro do folículo dominante foi realizado a cada 24 horas, a partir
380 do 8º até o 12º dia do protocolo, por via retal através de ultrassom Aloka PROSOUND2
381 (Aloka Co., Tóquio, Japão) equipado com transdutor linear de 7,5 MHz. Essa avaliação foi
382 realizada diariamente, logo após a ordenha e anterior a oferta de dieta total aos animais. A
383 ovulação foi determinada pelo desaparecimento do folículo dominante. No 15º e 23º dia do
384 protocolo (5º e 13º dia após a ovulação) realizou-se uma nova avaliação ultrassonográfica
385 dos ovários nos animais ovulatórios a fim de verificar a área do corpo lúteo formado (Figura
386 1). Os dias das avaliações foram escolhidos levando em consideração que o CL é classificado
387 como jovem (1-4 dias), maduro (5-16 dias), e em fase de regressão (17º dia) até luteólise
388 completa (Pieterse et al., 1990).

389 Coletas de sangue

390 As coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 8 (antes da aplicação do
391 tratamento e 12 horas após o tratamento), 9, 10, 11, 12, 15, 23 do protocolo (Figura 1),
392 concomitante as avaliações ultrassonográficas, através do complexo arteriovenoso da
393 coccígea em tubos sem anticoagulante para avaliação dos níveis circulantes de NEFA, E₂ e P₄
394 e em um tubo contendo fluoreto de sódio para avaliação dos níveis circulantes de glicose. Os
395 tubos foram centrifugados a 1000 xg e o soro foi separado e alocado em microtubos
396 devidamente identificados e armazenados a -20°C até a realização das análises.

397 Análises bioquímicas

398 A avaliação de NEFA foi realizada nas amostras dos dias 0, 8 (0 hora do tratamento)
399 e 10 do protocolo, com Kit para avaliação de NEFA da empresa Wako no leitor de placas
400 Termo Plate. Os níveis de glicose foram avaliados nos dias 0, 8 (0 e 12 horas do tratamento),
401 9, 10, 11, 12, 15 e 23 do protocolo, com Kit para avaliação de glicose da empresa Labtest no
402 leitor automático Lambax Plenno.

403 Análises hormonais

404 A avaliação dos níveis de E₂ foi realizada nos dias 8, 9 e 10 e dos níveis de P₄ nos
405 dias 15 e 23, ambos através da técnica de quimiluminescência com Kit para avaliação de E₂ e
406 P₄ da empresa Siemens no aparelho Adivia Centaur.

407 Análise estatística

408 A análise estatística foi realizada no programa NCSS (2005) considerando-se como
409 fator fixo o tratamento. Para as análises da taxa de crescimento do folículo dominante, área
410 lútea, níveis de E₂, P₄, glicose e NEFA foi utilizado a análise de medidas repetidas. Os
411 resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. Sendo considerados
412 significativos valores iguais ou inferiores a $P \leq 0,05$.

413 Resultados e discussão

No decorrer do experimento foram excluídos 4 animais do GI (três vacas por afecções clínicas e uma vaca por não apresentar crescimento folicular). Sendo realizado o acompanhamento ultrassonográfico do crescimento folicular e coletas de sangue em 17 animais (GC= 9, GI=8).

Podemos observar uma redução ($P= 0,01$) dos níveis circulantes de glicose 12 horas após a aplicação de insulina no GI ($39,5 \pm 2,65$ mg/dL) em relação ao GC ($57,5 \pm 2,81$ mg/dL) (Figura 2 A), com retorno dos seus níveis 24 horas após. Esse efeito deve-se ao estímulo da insulina à entrada de glicose nos tecidos (Vernon, 1989). Desta forma, pôde-se comprovar que a utilização da insulina neste experimento realizou sua função fisiológica. Além disso, no decorrer das avaliações os níveis de glicose (Figura 2 A) se mantiveram dentro dos valores fisiológicos para a espécie, que é de 45 à 74,88 mg/dL (Kaneco et al., 1997, Lago et al., 2004). Em relação aos níveis de NEFA (Figura 2 B) os animais de ambos os grupos apresentaram um comportamento semelhante ($P=0,30$), com valores dentro do fisiológico que é $\leq 0,7$ mmol/L em vacas lactantes (Corrêa et al., 2010). Não encontramos uma relação dos níveis de NEFA (Figura 2 B) com o ECC (Figura 2 C), pois ao avaliarmos o ECC dos animais de ambos os grupos, ao longo dos manejos observamos que estes apresentaram uma perda de condição corporal significativa do dia 0 e 8 (ECC 2,3) em relação aos dias 10 (ECC 2,0) 15 (ECC 1,9) e 23 (ECC 2,1) ($P \leq 0,001$), indicado um quadro de catabolismo, e isso nos leva a acreditar que os baixos níveis de NEFA se devam a pouca deposição de gordura que os animais já apresentavam no início das avaliações (Figura 2 C).

O crescimento do folículo dominante entre o dia 8 e 10 (GC $1,61 \pm 0,21$ mm GI $0,81 \pm 0,22$ mm) (Figura 3 A $P=0,11$) não foi influenciado pelo maior transporte de glicose para os tecidos 12 horas após a aplicação insulina no GI (Figura 2 A), e a taxa de crescimento diária também foi semelhante ($P=0,11$) entre o GC $0,53 \pm 0,21$ mm e o grupo insulina $0,26 \pm 0,22$ mm, porém, inferior ao encontrado por outros pesquisadores (Rodhes, 1995,

Rajmon et al., 2012). Deve-se considerar que os animais de nosso experimento, encontravam-se em catabolismo com perda de condição corporal (Figura 2 C), que se relaciona a baixos níveis circulantes de IGF-I, insulina e glicose (Leon et al., 2004) e essa privação de energia reduz a frequência de pulsos de hormônio luteinizante (LH), prejudicando assim o crescimento, maturação folicular e a ovulação (Butler & Smith, 1989, Canfield et al., 1990, Beam & Butler, 1997, 1998). Além da questão metabólica, ao analisarmos o diâmetro do folículo dominante dos grupos (Figura 3 A), podemos observar que apesar de não apresentar diferença ($P \geq 0,05$) os animais do grupo insulina apresentavam um maior diâmetro folicular no dia 8 do protocolo, momento da divisão dos grupos e aplicação do tratamento.

O diâmetro folicular do folículo dominante não foi incrementado pelo tratamento (Figura 3 A $P = 0,27$). Porém, ao avaliarmos o diâmetro folicular, independente do grupo, observamos um incremento significativo ($P \leq 0,001$) do diâmetro folicular entre o dia 8 ($11,39 \pm 0,15\text{mm}$) e 10 ($12,60 \pm 0,15\text{mm}$). Esse crescimento reflete o aumento das células foliculares e a capacidade esteroidogênica do folículo. Porém, mesmo com esse crescimento entre o dia 8 e 10, o diâmetro do folículo pré-ovulatório de ambos os grupos de nosso estudo, foi inferior ao relatado por outros autores (Peters & Benboulaid, 1998, Colazo & Ambrose, 2015) e isso refletiu no número de animais que tiveram capacidade de ovular. Dos 17 animais acompanhados 10 ovularam, sendo 5/9 do GC e 5/8 do GI representando 55,5% e 62,5% respectivamente. As vacas do GI e GC ovularam em um intervalo de 24 a 48 horas após a aplicação do indutor de ovulação GnRH, sendo semelhante ao padrão de ovulação encontrado no estudo de Peters & Benboulaid, (1998).

O diâmetro do folículo dominante apenas das vacas que ovularam (Tabela 1), não diferiu entre os grupos ($P = 0,74$), com diâmetro mínimo ovulatório em ambos de 11,5 mm e máximo de 15,0 mm. No estudo de Colazo & Ambrose, (2015) todos os folículos ovulatórios excediam 11 mm de diâmetro também. Porém o diâmetro médio ovulatório de nosso estudo

foi inferior aos 16,1 mm encontrado por Colazo & Ambrose, (2015) e entre 15 e 20 mm por Peters & Benboulaid, (1998). Folículos de menor diâmetro apresentam menor capacidade ovulatória, pois esse evento está associado com a aquisição de receptores de LH nas células da granulosa no momento da divergência folicular (Xu et al., 1995). Acreditamos que o menor diâmetro do folículo dominante das vacas ovulatórias de nosso estudo (Tabela 1) quando comparado aos estudos realizados por outros pesquisadores, seja também consequência da perda de condição corporal ao longo das avaliações. A aplicação de uma única dose de insulina não foi capaz de minimizar os efeitos supressores do baixo ECC e incrementar o diâmetro do folículo ovulatório. O diâmetro do folículo dominante das vacas anovulatórias ($11,3 \pm 0,63$ mm), como esperado, foi menor ($P=0,02$) comparado às vacas ovulatórias ($13,45 \pm 0,53$ mm), porém não foi diferente entre os grupos (GC $11,2 \text{ mm} \pm 1,01$ mm e GI $11,5 \text{ mm} \pm 1,01$ mm) ($P=0,87$).

Os níveis de E_2 sanguíneo não diferiram na média do período avaliado ($P=0,44$) entre o GC $26,70 \pm 3,4$ pg/ml e GI $30,77 \pm 3,83$ pg/ml nem entre os dias (Figura 3B, $P=0,45$). As concentrações de estradiol- 17β aumentam com o crescimento dos folículos (Rahman et al., 2008), devido ao aumento do número de células da granulosa e a atividade da aromatase (Khan et al., 2012, Kor, 2013). Em nosso estudo como o diâmetro folicular em ambos os grupos foi similar e o crescimento foi em uma taxa pequena os níveis se mantiveram semelhantes ao longo das avaliações. Folículos com diâmetro reduzido resultam em menores concentrações de E_2 (Vasconcelos et al., 2001, 2009) que reflete na apresentação de cio (Perry et al., 2014).

A área lútea no 15º e 23º dia do protocolo não apresentou diferença entre os grupos ($P=0,44$ e $P=0,11$ respectivamente) (Tabela 1). Um animal do GI apresentou ciclo estral curto não sendo detectada a presença do CL na segunda avaliação ultrassonográfica. Esse evento ocorre devido a luteólise prematura, (Hinshelwood et al., 1982, Garcia-Winder et al., 1986,

Eger et al., 1988), e está relacionada a produção inadequada de E_2 pelo folículo pré-ovulatório, levando a uma inadequada inibição dos receptores de ocitocina no útero (Mann & Lamming, 2000). Apesar de não ter sido detectada diferença ($P=0,30$), o GC apresentou uma redução numérica da área lútea da primeira para a segunda avaliação enquanto no GI ocorreu um incremento numérico ($P=0,82$) desse parâmetro entre as avaliações. Diferentemente do observado no GC, Rodhes, (1995) não observou alteração da área lútea em animais que passaram por restrição alimentar. Essa redução da área refletiu nos níveis de P_4 (Tabela 1), os quais foram semelhantes entre os grupos nas duas avaliações ($P\geq 0,05$), porém, assim como na área lútea, observa-se uma redução numérica ($P=0,77$) dos níveis de P_4 da primeira para a segunda avaliação no GC, devido ao fato de 3 dos 5 animais desse grupo apresentarem concentrações inferiores à 1 ng/ ml, indicado luteólise. Enquanto no GI houve um incremento numérico da P_4 ($P=0,15$). Essa relação entre a área lútea e a P_4 observada em nosso estudo deve-se ao fato das concentrações de P_4 refletirem o crescimento, a manutenção e a regressão luteal (Spano & Silva, 1992). Sendo que uma correlação positiva ($r=0,80$, $P\leq 0,05$) foi encontrada em nosso estudo entre a área lútea e os níveis de progesterona no dia 23. Os níveis de P_4 sanguíneo de nosso estudo foram inferiores ao relatado por (Badinga et al., 1994). Cinco animais, sendo 3 do GI e 2 do GC apresentaram corpo lúteo cavitário, para avaliação da área lútea desses folículos, subtraiu-se o diâmetro da cavidade interna do diâmetro externo do folículo. O tempo de permanência dessas cavidades depende da reorganização gradual do tecido luteal e tende a desaparecer com o transcorrer do ciclo estral e a presença da cavidade luteal não altera a concentração plasmática de P_4 (Kito et al., 1986).

Pode-se inferir que o desafio metabólico imposto a estes animais, o qual é semelhante ao que ocorre em propriedades leiteiras comerciais, tenha influenciado negativamente o desenvolvimento do folículo ovulatório, e a aplicação de uma única dose de insulina não foi capaz de superar essa condição metabólica. Mais pesquisas devem ser realizadas com diferentes formas de aplicação, liberação controlada de insulina, com um

515 número maior de animais, assim como utilizar novas metodologias como injeção
516 intrafolicular para elucidar possíveis mecanismos fisiológicos locais do folículo dominante.

517 **Conclusão**

518 A aplicação de uma única dose de 0,25 UI/Kg de insulina via subcutânea não foi
519 capaz de incrementar o diâmetro do folículo, produção de estradiol, área lútea e produção de
520 progesterona em vacas leiteiras.

521 **Referências**

- 522 Badinga, L., W. W. Thatcher, C. J. Wilcox, G. Morris, K. Entwistle, D. Wolfenson. 1994.
523 Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol^{17b},
524 progesterone and luteinizing hormone in lactating holstein cows. Theriogenology 42:
525 1263-1274.
- 526 Beam, S. W., and W. R. Butler. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior
527 to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat.
528 Biology of reproduction 56: 133-142.
- 529 Beam, S. W., and W. R. Butler. 1998. Energy balance, metabolic hormones, and early
530 postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. Journal of dairy
531 science 81: 121-131.
- 532 Beam, S. W., and W. R. Butler. 1999. Effects of energy balance on follicular development
533 and first ovulation in postpartum dairy cows. Journal of reproduction and fertility.
534 Supplement 54: 411-424.
- 535 Bello, N. M., J. P. Steibel, and J. R. Pursley. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH
536 improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows.
537 Journal of dairy science 89: 3413-3424.

- 538 Butler, S. T. et al. 2003. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced
539 negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH
540 receptor 1A. *The Journal of endocrinology* 176: 205-217.
- 541 Butler, W. R. 1998. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in
542 dairy cattle. *Journal of dairy science* 81: 2533-2539.
- 543 Butler, W. R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle.
544 *Animal reproduction science* 60-61: 449-457.
- 545 Butler, W. R., and R. D. Smith. 1989. Interrelationships between energy balance and
546 postpartum reproductive function in dairy cattle. *Journal of dairy science* 72: 767-783.
- 547 Canfield, R. W., C. J. Sniffen, and W. R. Butler. 1990. Effects of excess degradable protein
548 on postpartum reproduction and energy balance in dairy cattle. *Journal of dairy*
549 *science* 73: 2342-2349.
- 550 Colazo, M. G., and D. J. Ambrose. 2015. Effect of initial GnRH and duration of progesterone
551 insert treatment on the fertility of lactating dairy cows. *Reproduction in domestic*
552 *animals = Zuchthygiene* 50: 497-504.
- 553 Corrêa, M. N. S., F. H. D. Gozales, S. C, Silva. 2010. *Transtornos Metabólicos nos Animais*
554 *Domésticos*. p. 518. Ed Gráfica Universitária Prec-UFPel.
- 555 Eger, S., M. Shemesh, H.Schindler, S. Amir, R. H. Foote. 1988. Characterization of short
556 luteal cycles in the early post-partum period and their relation to reproductive
557 performance in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 16: 215-224.
- 558 Garcia-Winder, M. et al. 1986. Endocrine profiles associated with life span of induced
559 corpora lutea in postpartum beef cows. *Journal of animal science* 62: 1353-1362.
- 560 Gong, J. G., W. J. Lee, P. C. Garnsworthy, and R. Webb. 2002. Effect of dietary-induced
561 increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on
562 reproductive function in dairy cows. *Reproduction* 123: 419-427.

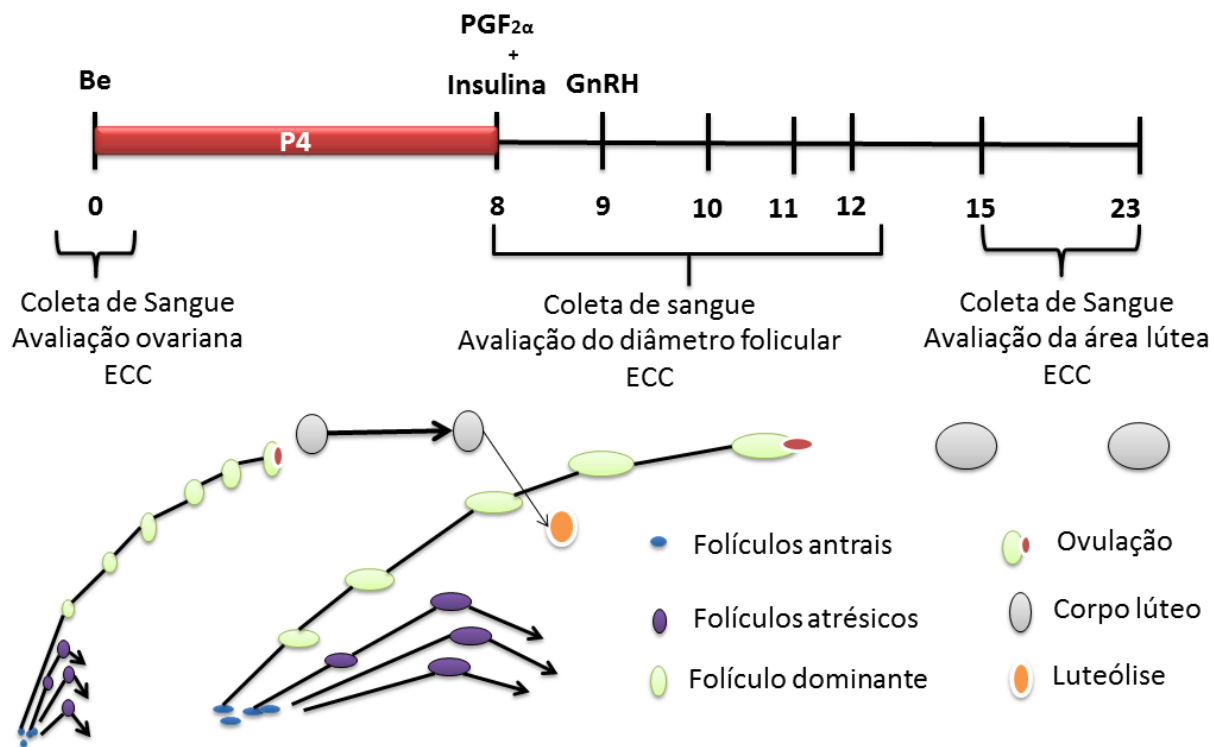
- 563 Gutierrez, C. G., J. G. Gong, T. A. Bramley, and R. Webb. 2006. Selection on predicted
564 breeding value for milk production delays ovulation independently of changes in
565 follicular development, milk production and body weight. *Animal reproduction*
566 *science* 95: 193-205.
- 567 Hinshelwood, M. M., P. J. Hansen, E. R. Hauser. 1982. Short oestrous cycles in postpartum
568 cows as influenced by level of milk production, suckling, diet, season of calving and
569 interval to first estrus. *Theriogenology* 18: 383-392.
- 570 Kaneko, J. J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 1997. 5. ed., New York, Academic
571 Press.
- 572 Khan, F. A. et al. 2012. Alterations in follicular fluid estradiol, progesterone and insulin
573 concentrations during ovarian acyclicity in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal*
574 *reproduction science* 130: 27-32.
- 575 Kito, S., K. Okuda, K. Miyazawa, et al. 1986. Study on the appearance of the cavity in the
576 corpus luteum of cows by using ultrasound scanning. *Theriogenology* 25: 325-333.
- 577 Kor, N. M., K. Moradi. 2013. A Review of biochemical metabolites concentration and
578 hormonal composition of ovarian follicular fluid in domestic animals. *Annu Rev Res*
579 *Biol.* 3: 246-255.
- 580 Lago, E. P., A. P. D. Costa, A. V. Pires, I. Susin, V. P. Farias, L. A. Lago. 2004. Parâmetros
581 metabólicos em vacas leiteiras durante o período de transição pós-parto. *R. bras. Ci.*
582 *Vet.* 11: 98-103.
- 583 Leon, H. V., J. Hernandez-Ceron, D. H. Keislert, C.G. GUTIERREZ. (2004). Plasma
584 concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I, and insulin in relation to changes
585 in body condition score in heifers. *Journal of animal science* 82: 445-451.
- 586 Mann, G. E., and G. E. Lamming. 2000. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol
587 secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the
588 cow. *Animal reproduction science* 64: 171-180.

- 589 Nebel, R. L., and M. L. McGilliard. 1993. Interactions of high milk yield and reproductive
590 performance in dairy cows. *Journal of dairy science* 76: 3257-3268.
- 591 Perry, G. A., O. L. Swanson, E. L. Larimore, B. L. Perry, G. D. Djira. 2014. Relationship of
592 follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting
593 estrus during a fixed-time AI protocol. *Domestic Animal Endocrinology* 48: 15–20.
- 594 Peters, A. R., M. Benboulaid. 1998. Studies on the timing of ovulation after synchronization
595 treatments in cattle. *Reprod Domest Anim.* 33: 313–315.
- 596 Pieterse, M. C., O. Szenci, A. H. Willemse, et al. 1990. Early pregnancy diagnosis in cattle
597 by means of Linear-Array Real-Time ultrasound scanning of the uterus and a
598 quantitative and qualitative milk progesterone test. *Theriogenology* 33: 697-707.
- 599 Pursley, J. R., M. R. Kosorok, and M. C. Wiltbank. 1997. Reproductive management of
600 lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *Journal of dairy science* 80:
601 301-306.
- 602 Rahman, Z. U., S. A. Bukhari, N. Ahmad, N. Akhtar, A. Ijaz, M. S. Yousaf, I. U. Haq. 2008.
603 Dynamics of follicular fluid in one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Reprod*
604 *Domest Anim.* 43: 664-671.
- 605 Rajmon, R., J. Šichtař, L. Vostrý, D. Řehák. 2012. Ovarian follicle growth dynamics during
606 the postpartum period in Holstein cows and effects of contemporary cyst occurrence.
607 *Czech J. Anim. Sci.* 57: 562–572.
- 608 Rhodes, F.M., L.A. Fitzpatrick, K. W. Entwistle, G. Déath. 1995. Sequential changes in
609 ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional
610 anoestrous. *Journal of Reproduction and Fertility* 10: 441-49.
- 611 Rostami, B. et al. 2011. Effect of eCG on early resumption of ovarian activity in postpartum
612 dairy cows. *Animal reproduction science* 128: 100-106.
- 613 Schneider, A., L. F. M. Pfeifer, E. Schmitt, I. Bianchi, M. B. Vieira, E. G. Xavier, F. A. B.
614 Del Pino, M. N. Corrêa. 2010. The use of insulin to improve fertility of

- 615 timed-inseminated postpartum suckled beef cows. *Pesq. agropec. bras.* 45: 1219-
616 1221.
- 617 Shimizu, T. et al. 2008. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular
618 development in the bovine ovary. *Animal reproduction science* 106: 143-152.
- 619 Silva, E., R. A. Sterry, and P. M. Fricke. 2007. Assessment of a practical method for
620 identifying anovular dairy cows synchronized for first postpartum timed artificial
621 insemination. *Journal of dairy science* 90: 3255-3262.
- 622 Snijders, S. E. et al. 2001. Genetic merit for milk production and reproductive success in
623 dairy cows. *Animal reproduction science* 65: 17-31.
- 624 Vasconcelos, J. L., O.G. Sá Filho, G.C. Perez, A.T. Silva. 2009. Intravaginal progesterone
625 device and/or temporary weaning on reproductive performance of anestrous crossbred
626 Angus x Nelore cows. *Animal reproduction science*. 111: 302-311.
- 627 Vasconcelos, J. L., R. Sartori, H. N. Oliveira, J. G. Guenther, and M. C. Wiltbank. 2001.
628 Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and
629 pregnancy rate. *Theriogenology* 56: 307-314.
- 630 Vasconcelos, J. L. M., M. H. C. Pereira, M. Meneghetti, C. C. Dias, O.G. Sá Filho, R. F. G.
631 Peres, A. D. P. Rodrigues, Wiltbank, M. C. 2013. Relationships between growth of
632 the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. *Anim. Reprod.*
633 3: 206-214.
- 634 Vernon, R. G. 1989. Endocrine control of metabolic adaptation during lactation. *The*
635 *Proceedings of the Nutrition Society* 48: 23-32.
- 636 Webb, R., P. C. Garnsworthy, J. G. Gong, and D. G. Armstrong. 2004. Control of follicular
637 growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of animal science* 82 E-
638 Suppl: E63-74.

639 Xu, Z. et al. 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone
640 receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular
641 wave. *Biology of reproduction* 53: 951-95

642



643

644

645 Figura 1. Delineamento experimental realizado em vacas holandês primíparas tratadas com insulina durante

646 protocolo de IATF.

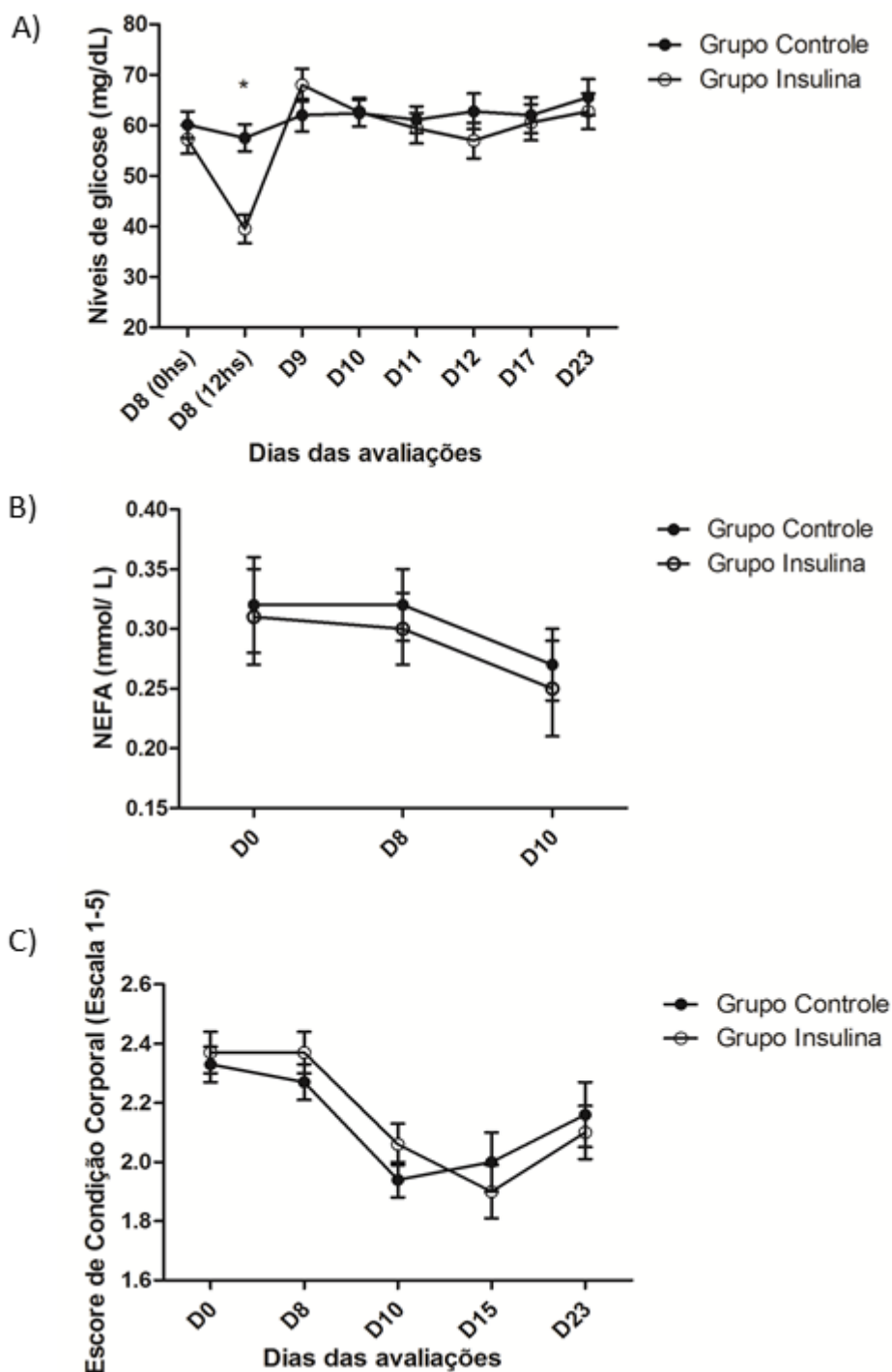


Figura 2. A) Níveis de glicose nos dias 8 (0 e 12 horas), 9, 10, 11, 12, 15, 23. B) Níveis de NEFA (mg/dL) entre os dias 0, 8, 10. C) Escore de Condição Corporal nos dias 0, 8, 10, 15 e 23 de vacas primíparas da raça holandês tratadas com Insulina (GI) durante o protocolo de IATF, comparado a animais que não receberam a aplicação de Insulina (GC).

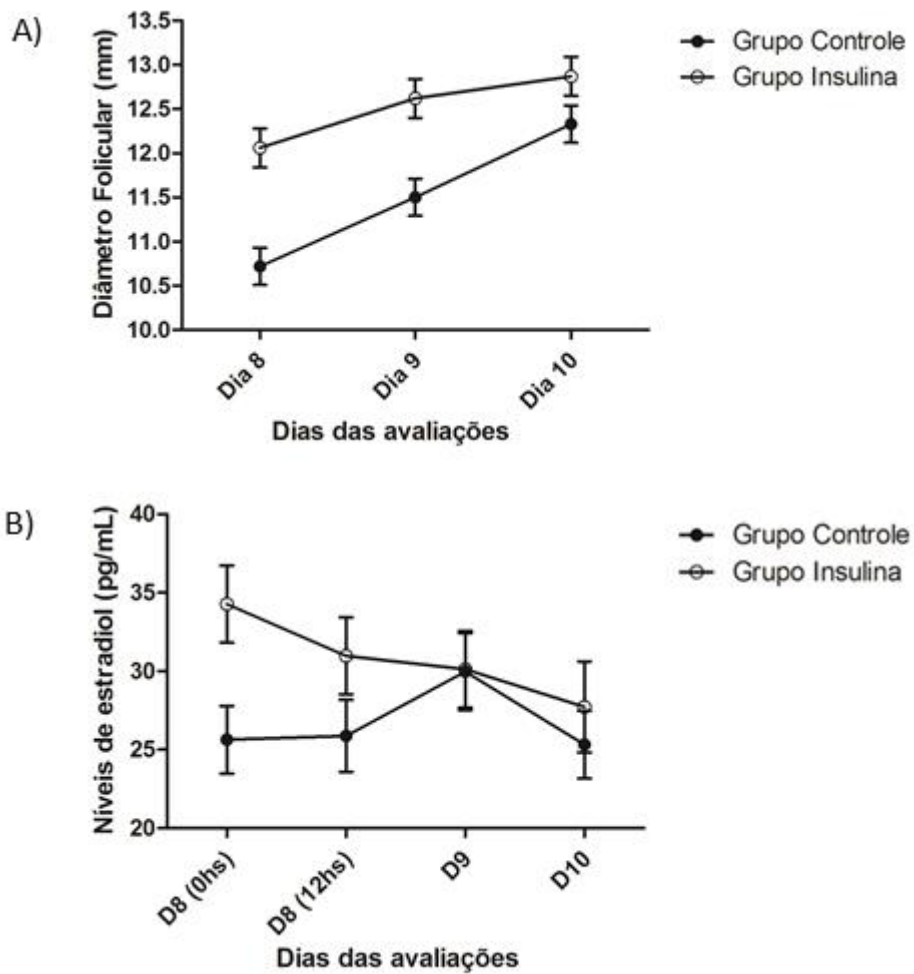


Figura 3. A) Diâmetro folicular nos dias 8, 9, 10 B) Níveis de E₂ entre os dias 8 (0 e 12 horas), 9, 10, de vacas primíparas da raça holandês tratadas com Insulina (GI) durante o protocolo de IATF, comparado a animais que não receberam a aplicação de Insulina (GC)

658 Tabela 1. Parâmetros das novilhas ovulatórias da raça holandês acompanhadas durante protocolo de IATF,
 659 tratados com Insulina (GI) comparado a animais que não receberam a aplicação de Insulina (GC).

	GC (média ± erro padrão)	GI (média ± erro padrão)	Valor de P
Diâmetro do folículo ovulatório (D10) (mm)	13,4±0,65	13,70,65	0,74
Área Lútea D15 (mm ²)	28,03±3,77	35,64±3,77	0,44
Área Lútea D23 (mm ²)	22,04±3,77	38,07±4,21	0,11
P ₄ (D15) ng/mL	4,02±1,23	3,77±1,23	0,85
P ₄ (D23) ng/mL	3,38±1,23	6,54±1,37	0,27

660

4.2 Manuscrito 2 – Avaliação do crescimento folicular de vacas *Bos Taurus* tratadas estrategicamente com insulina

Andressa Stein Maffi*, Mityelle Chaves*, Lucas Balinhas Farias*, Cassio Cassal Brauner*, Joabel Tonellotto dos Santos*, Carlos Gomes Martin[†], Marcio Nunes Corrêa*

*NUPEEC, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

[†]Médico Veterinário , In Vitro Sul, Rio Grande, RS, Brasil.

Manuscrito submetido à revista *Journal of Animal Science*

Resumo

O momento do retorno à ciclicidade após o parto determina a eficiência reprodutiva de um rebanho de cria em bovinos de corte. A associação da baixa condição corporal e a amamentação causam baixos níveis sistêmicos de IGF-I, insulina e glicose, modificando a frequência de pulsos de LH e, conseqüentemente, comprometendo o crescimento folicular. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação estratégica de insulina sobre o crescimento folicular, produção de progesterona e taxa de prenhez em bovinos de corte. Foram realizados 2 estudos, no experimento 1, 215 vacas (GC=109 GI=106) foram submetidas a um protocolo que consistiu na aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol e inserção de um dispositivo de liberação lenta de progesterona no dia 0 e avaliou-se o crescimento folicular e a taxa de prenhez. No dia 9, procedeu-se com a remoção de P₄, a aplicação de 0,5 mg de cipionato de estradiol, 12,5 mg de dinoprost e aplicação de 0,25 UI / kg de insulina, nos animais tratados e no dia 11 procedeu-se com a inseminação artificial. O experimento 2 foi realizado com 85 vacas (GC=49 GI=36) submetidas a um protocolo de Transferência de Embrião em Tempo Fixo e avaliou-se os níveis de progesterona. No dia 0 fez-se aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol e a inserção de um dispositivo de liberação lenta de progesterona. No 5º dia do protocolo, fez-se a aplicação de 0,150 mg de d-Cloprostenol. No dia 8 fez-se a remoção do dispositivo de P₄, aplicação de 20 mg foltropina de pituitária suína e de 0,25 UI / kg de insulina nos animais tratados, no dia 9 foi aplicado 1 mg de benzoato de estradiol e no dia 17 procedeu-se com a transferência dos embriões. No experimento 1 a taxa de crescimento folicular e a taxa de prenhez foram semelhantes entre os grupos ($P > 0,05$) e a produção de P₄ não foi diferente no experimento 2. A utilização estratégica de insulina em vacas de corte não altera o diâmetro do folículo ovulatório, níveis de progesterona e taxa de prenhez.

Palavras Chave: bovinos de corte, diâmetro folicular, progesterona, reprodução.

695 **Introdução**

696 O momento do retorno a ciclicidade após o parto em vacas de corte é o fator
697 determinante da eficiência reprodutiva geral do rebanho e como consequência da eficiência
698 econômica dos sistemas de cria (Hess et al., 2005). Fisiologicamente o pós-parto é marcado
699 por um período em torno de 30 dias de anestro onde ocorrem processos necessários para o
700 reestabelecimento das condições fisiológicas do sistema reprodutivo (Short et al., 1990). Na
701 segunda semana pós-parto se observa um aumento dos níveis circulantes de Hormônio
702 Folículo Estimulante (FSH) e o recrutamento de uma onda folicular (Yavas & Walton, 2000),
703 porém alguns fatores como perda de condição corporal e amamentação (Lucy, 2003,
704 Williams, 1990) ocasionam baixos níveis sistêmicos de Fator de Crescimento Semelhante à
705 Insulina (IGF-I), glicose e insulina, que alteraram a frequência de pulsos de Hormônio
706 Luteinizante (LH), comprometendo, consequentemente, o crescimento folicular (Butler &
707 Smith, 1989, Grimard et al., 1995, Williams, 1990, Wiltbank et al., 2002, Hess et al., 2005).
708 Com isso, vacas comprometidas nutricionalmente podem permanecer acíclicas além dos 100
709 dias pós-parto (Williams, 1990; Short et al., 1990).

710 A fim de reduzir o intervalo entre parto e concepção, podem ser utilizados
711 protocolos hormonais como a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), porém a
712 resposta frente a esses tratamentos hormonais ainda mostra uma grande variação dos
713 resultados (Baruselli et al., 2004, Colazo & Ambrose, 2015) e parte disso, deve-se a presença
714 do terneiro e o baixo ECC, que afetam negativamente o diâmetro do folículo dominante no
715 momento da IATF e são barreiras a obtenção de melhores resultados. Folículos menores que
716 11,5 mm dão origem a corpos lúteos pequenos os quais produzem níveis de progesterona
717 inferiores (Vasconcelos et al., 2001) reduzindo a taxa de concepção (Lamb et al., 2001) e
718 elevando as taxas de perdas embrionárias (Perry et al., 2005). Sendo que em bovinos *Bos*
719 *taurus*, foi observado uma melhora na taxa de prenhez de animais que apresentavam folículos
720 entre 13 e 15 mm no momento da IATF (Pfeifer et al., 2009).

Os efeitos da Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) quando empregado nas condições descritas acima com o intuito de melhorar a eficiência dos protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) já estão bem descritos na literatura (Barruselli, 2004 Rostami, 2011). Entretanto ainda são poucas as pesquisas estudando a ação de hormônios metabólicos como da insulina, a qual é um importante sinalizador da dinâmica folicular em bovinos (Webb et al., 2004, Hess et al., 2005), com capacidade de estimular a proliferação celular e a esteroidogênese folicular (Wettemann & Bossis, 2000). Um estudo realizado por nosso grupo demonstrou que a associação de insulina ao eCG durante protocolo de IATF em bovinos da raça Angus, promoveu melhora da taxa de gestação em animais com ECC menor que 2,5 (em uma escala de 1 a 5), com cria ao pé, quando comparado a animais que receberam apenas eCG (Schneider et al., 2010). Sendo assim, a hipótese de nosso estudo é que a aplicação de insulina auxilia no desenvolvimento final do folículo dominante, produção de progesterona e taxa de gestação. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da aplicação de uma dose de insulina sobre o crescimento folicular, produção de progesterona e taxa de prenhez em bovinos.

Material e métodos

Experimento 1

Animais

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo comitê de ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, sob número 6773.

O experimento 1 foi realizado em duas propriedades destinadas a produção de bovinos de corte localizadas no município de Pinheiro Machado-RS, nos meses de fevereiro e dezembro de 2015. Ao todo foram avaliadas 215 vacas cruzas européias (predominantemente Angus e Hereford), sendo que na propriedade 1 foram avaliados 71 vacas cruzas e Hereford com cria ao pé e na propriedade 2 foram avaliadas 144 vacas sendo 80 com cria ao pé, e 64

vacas sem cria ao pé. Os animais possuíam entre 3 e 9 anos de idade e entre 40 e 90 dias pós-parto e foram manejados em pastagens de campo nativo com livre acesso à água e sal mineral.

Tratamento hormonal

Os animais de ambas as propriedades foram submetidos a um protocolo de IATF que consistiu na aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol –, 1 mg/mL⁻¹, Gonadiol® (Zoetis, São Paulo, Brasil) e inserção de um dispositivo de liberação lenta de progesterona (P4) 1,9 g de progesterona CIDR®, (Zoetis, São Paulo, Brasil) no dia 0. No 9º dia do protocolo, procedeu-se com a retirada da P4, aplicação de 0,5 mg de cipionato de estradiol – i.m., 2 mg/mL⁻¹, E.C.P® –, (Zoetis, São Paulo, Brasil) e 12.5 mg de dinoprost – i.m., 5 mg/mL⁻¹, Lutalyse®, (Zoetis, São Paulo, Brasil) (PGF₂α). No 11º dia do protocolo realizou-se a inseminação artificial (IA). A divisão dos animais entre grupo tratado com insulina (n=106) e grupo controle (n= 109) foi realizada no 9º dia do protocolo homogeneamente a partir do diâmetro do folículo dominante e ECC. As vacas do grupo tratado receberam a aplicação de 0,25 UI/ kg de insulina, Novolin N®, (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) via subcutânea.

Parâmetros avaliados

O ECC foi avaliado no dia 0 do protocolo, em uma escala de 1 a 5 (Moraes et al. 2007), (onde 1 = muito magro e 5 = muito gordo) nos 215 animais, além disso todos os animais foram marcados na garupa com bastão marcador no dia 9 para identificação dos animais que apresentaram cio que foi realizada no 11º dia do protocolo através da presença ou ausência da tinta na garupa e 30 dias após a IA fez-se o diagnóstico de gestação com auxílio de ultrassom Welld Wed-3000V Vet, acoplado a uma probe linear 7,5 MHz, inserida via transretal. A avaliação do diâmetro do folículo dominante foi realizado apenas nos 71 animais da propriedade 1 através de ultrassom Welld Wed-3000V Vet, acoplado a uma probe

770 linear 7,5 MHz inserida via transretal., sendo realizada a primeira avaliação do diâmetro do
771 folículo dominante no dia 9 e uma segunda avaliação no dia 11.

772 Experimento 2

773 Animais

774 O experimento 2 foi realizado durante os meses de janeiro a março de 2015 em duas
775 propriedades destinadas a produção de vacas de corte utilizadas como receptoras de embrião,
776 totalizando 85 animais avaliados (GC GI). A propriedade 1 localizada na cidade de Santa
777 Vitória do Palmar-RS e a propriedade 2 localizada na cidade de Arroio Grande-RS. Na
778 propriedade 1 foram avaliadas 48 vacas receptoras de embriões da raça Hereford e cruzas
779 (*Bos Indicus x Bos Taurus*), solteiras, 3 anos de idade, manejadas em pastagem cultivada de
780 azevém (*Lolium multiflorum*) e trevo branco (*Trifolium Repens*). Na propriedade 2 foram
781 avaliadas 37 vacas receptoras de embriões da raça Aberdeen Angus e cruzas (*Bos Indicus x*
782 *Bos Taurus*), com cria ao pé, de 4 a 6 anos de idade, manejadas em campo com pastagem
783 cultivada de azevém (*Lolium multiflorum*) e aveia (*avena strigosa*) e sal mineral a vontade.

784 Protocolo Hormonal

785 O protocolo de sincronização para a TETF em ambas as propriedades consistiu dos
786 seguintes passos, dia 0 aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol , 1 mg/mL⁻¹, RIC-BE[®]–,
787 (Tecnopec, São Paulo, Brasil) e inserção de um dispositivo de liberação lenta de
788 progesterona (P4) 1,9 g de progesterona, CIDR[®]–, (Zoetis, São Paulo, Brasil). No 5º dia do
789 protocolo, procedeu-se com a aplicação de 0,150 mg de d-Cloprostenol – i.m., 0,150 mg / 2
790 mL⁻¹, Prolise[®] –, (Tecnopec, São Paulo, Brasil) (PGF₂α). No 8º dia retirada da P4, aplicação
791 de 20 mg de foltropina de pituitária suína – i.m., 20 mg / 1 mL⁻¹, Folltropin[®] –, (Tecnopec,
792 São Paulo, Brasil) e a divisão dos animais em grupo controle (GC 50) e grupo tratado (GI
793 36) que recebeu a aplicação de 0,25 UI/ kg de insulina, Novolin[®] N (Novo Nordisk,

794 Bagsvaerd, Denmark), no 9º dia aplicou-se 1 mg de benzoato de estradiol –, 1 mg/mL⁻¹, RIC-
795 BE® (Tecnopec, São Paulo, Brasil) e no dia 17 do protocolo procedeu-se com a inovulação
796 nas vacas que responderam ao protocolo de TETF. Cada receptora recebeu uma anestesia
797 epidural baixa antes da inovulação com 4mL de cloridrato de lidocaína 2%. A camisa
798 sanitária plástica foi usada para prevenir a contaminação uterina e removida quando o
799 inovulador alcançava o primeiro anel cervical. O inovulador, com a bainha e a palheta
800 contendo o embrião, era levado à porção cranial do corno ipsilateral ao CL, onde o embrião
801 foi depositado, tendo a palpação retal como ferramenta de orientação.

802 Parâmetros avaliados

803 O ECC foi avaliado no dia 0 do protocolo, de forma visual (escala de 1 a 5) (Moraes
804 et al., 2007). A taxa de utilização dos animais foi calculada a partir da porcentagem de
805 animais que apresentavam corpo lúteo (CL) grau 1 no dia 17 do protocolo em relação ao
806 número de animais que foram protocolados. E o diagnóstico de prenhez foi realizado 30 dias
807 após a inovulação por via retal, com aparelho de ultrassom (Scanner B-mode, Aloka SSD 500,
808 Tokyo, Japan) conectado a uma probe 7.5 MHz linear.

809 Coletas de sangue

810 No 17º dia do protocolo realizou-se uma coleta de sangue através do complexo
811 arteriovenoso da coccígea em dois tubos sem anticoagulante, para avaliação dos níveis
812 sanguíneos de progesterona (P₄). Os tubos foram centrifugados a 1000 xg e o soro foi
813 separado e alocado em microtubos devidamente identificados e armazenados a -20°C até a
814 realização das análises.

815 Análises hormonais

816 Foi realizada avaliação dos níveis de progesterona no dia 17 do protocolo de TETF de
817 39 animais (GC, n:21; GI, n:18), através de quimiluminescência com Kit para avaliação de

818 P4 da empresa Siemens no aparelho Adivia Centaur. Desse total de animais, 16 vacas
819 estavam vazias aos 30 dias pós IA e 23 estavam prenhez.

820 Análise estatística

821 Os fatores fixos considerados foram o tratamento (Insulina e controle). O ECC e os
822 níveis de progesterona foram avaliados por análise de variância. O crescimento folicular foi
823 avaliado por medidas repetidas e a taxa de utilização e as taxas de prenhez, foram analisadas
824 pelo teste de Qui-quadrado. Todas as análises foram realizadas através do programa NCSS
825 (2005). Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Sendo
826 considerados significativos valores iguais ou inferiores a $P \leq 0,05$.

827 **Resultados e discussão**

828 Os animais do experimento 1 apresentaram em média um ponto a menos de
829 condição corporal (2,9) que os animais do experimento 2 (3,9).

830 A taxa de crescimento diário do folículo entre o 9º e 11º dia do protocolo avaliada
831 em 71 animais do experimento 1, não foi diferente ($P = 0,20$) entre os grupos (Tabela 1). Esse
832 crescimento diário foi inferior a taxas de crescimento diárias relatadas em outros estudos
833 (Lussier et al., 1987, Rhodes et al, 1995). Sabe-se que folículos antrais podem ter uma taxa de
834 crescimento de até 2 mm/dia (Lussier et al., 1987) com taxas de 1,2 mm/ dia em animais
835 desafiados nutricionalmente (Rhodes et al, 1995). Ao analisar os diâmetros dos folículos no
836 dia 11 do protocolo em nosso estudo, alguns animais apresentaram redução do diâmetro
837 folicular em relação à primeira avaliação (D9), o que acabou reduzindo a média do
838 crescimento folicular avaliado. O ECC dos animais pode ter influenciado a taxa de
839 crescimento, uma vez que este reflete o equilíbrio energético e relaciona-se com níveis
840 sistêmicos de IGF, insulina, GH e Neuropeptídio Y, os quais alteram a frequência dos pulsos
841 de LH (Keisler & Lucy, 1996 , DiCostanzo et al., 1999, Wettemann & Bossis, 2000, Leon et
842 al., 2004). Isto fica evidente quando constatamos que os animais com baixa condição

corporal, $ECC \leq 2,5$ apresentaram um decréscimo de $0,15\text{mm} \pm 0,44\text{mm}$, indicando uma possível atresia do folículo dominante. Enquanto isso, os animais com $ECC \geq 3,0$ apresentaram um crescimento de $0,93\text{mm} \pm 0,28\text{mm}$ ($P=0,04$). Sendo assim, este dado corrobora outros trabalhos que evidenciam a melhor eficiência de protocolos de IATF em animais em ECC igual ou superior a 3 (Hess, 2005, Bridges, 2012).

O diâmetro folicular no 11º dia do protocolo, dos 71 animais, não diferiu ($P=0,54$) entre os grupos (Tabela 1). Porém independente do grupo ocorreu um incremento ($P \leq 0,009$) do diâmetro do folículo dominante entre o dia 9 e 11 do protocolo. Esperava-se um maior incremento do diâmetro folicular nos animais tratados, em função do potencial anabólico da insulina, e de resultados de outros estudos, como o realizado por Simpson et al., (1994), que observaram um maior diâmetro de folículos grandes em Bovinos *Bos Indicus* tratados com insulina durante protocolo de superovulação. Ao avaliarmos a apresentação de cio das 215 vacas observamos uma porcentagem maior ($P \leq 0,05$) de cio no GC em relação ao GI (Tab. 1). Embora a média do ECC tenha sido semelhante entre os grupos houve uma maior porcentagem de animais com condição corporal acima de 3 ($67,0\%$ 71/ 208) no GC em relação aos animais tratados com insulina (62% 64/208), o que pode nos indicar uma melhor condição metabólica (Leon, 2004) para alguns animais do grupo controle. Esperávamos uma maior apresentação de cio no GI, com base nos resultados encontrados por Gupta et al., 2010 que trataram búfalas em anestro com insulina associada ao GnRH, onde a insulina promoveu uma maior apresentação de cio, porém nesse estudo, foram realizadas 3 aplicações de insulina diferente de nosso estudo que foi em dose única.

A taxa de prenhez avaliada nos 215 animais, não apresentou diferença ($P=0,64$) entre os grupos GC e GI (Tabela 1). Em um estudo realizado por Schneider et al., (2010), a aplicação de insulina quando associado ao eCG promoveu uma melhora na taxa de gestação de vacas *Bos Taurus* com baixo ECC (2,0). No nosso estudo não relacionamos a taxa de prenhez com o ECC devido ao baixo número de animais por grupo, no entanto, dividimos os

animais pelo diâmetro folicular em maior ou menor que 11mm. A taxa de prenhez dos animais com folículos maiores de 11 mm foram semelhantes numericamente entre os grupos GI (68,75 % 11/16) e GC (53,33 % 8/15). Entretanto observamos um incremento numérico da taxa de prenhez nos animais com folículos menores que 11mm e tratados com insulina (38,89% 7/18) em relação aos animais com folículos menores que 11mm e que não receberam a aplicação de insulina (17,65% 3/17). Devido ao baixo número de animais em cada grupo não é possível afirmar essa relação, mas associamos essa resposta, ao estímulo energético que a insulina promoveu, agindo como um sinalizador metabólico, como relatado no estudo Schneider et al., (2010).

A taxa de utilização dos animais como receptoras de embrião avaliada no experimento 2, foi semelhante ($P > 0,05$) entre os grupos GC (77,1% 37/48) e GI (78,9% 30/38). Acreditamos que uma das explicações para não obtermos efeito da insulina sobre a taxa de utilização neste experimento tenha sido o adequado ECC (3,9) e a relação desse parâmetro a níveis circulantes de insulina glicose e IGF-I (Leon et al., 2004) que se relacionam a adequada liberação de LH, diâmetro do folículo ovulatório e qualidade do corpo lúteo, com isso não sendo possível observar nenhum efeito da insulina, uma vez que os animais não estavam passando por um período de carência nutricional.

A produção de P₄ também foi semelhante ($P \geq 0,05$) entre os grupos (Figura 3), com níveis superiores ao relatado em outros estudos (Frade et al., 2014, Leal et al., 2009, Battochio et al., 2003, Solano et al., 2003). Existe uma correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de P₄ e qualidade do CL (Ambrose et al. , 1999), sendo que os CLs grandes produzem maior quantidade de progesterona em relação aos pequenos e médios (Leal et al. 2009). Este resultado era esperado em nosso estudo, uma vez que foram utilizados apenas animais com CL grau 1, de acordo com a avaliação prévia realizada por palpação retal. Além disso, os níveis de P₄ produzidos no dia 17 não tiveram relação ($P \geq 0,05$) com a taxa de prenhez dos animais.

O resultado da taxa de utilização e os níveis de P4 do estudo 2, associado aos resultados encontrados por Schneider et al., (2010) onde a aplicação de insulina associada ao eCG em animais em boa condição corporal não incrementou a taxa de prenhez, nos leva a acreditar em um potencial efeito da insulina apenas em animais nutricionalmente desafiados. Porém um número maior de pesquisas deve ser realizado e com um número maior de animais, relacionando a aplicação de insulina com ECC e diâmetro folicular, para obtenção de resultados mais concisos. Além disso, acreditamos que a falta de resposta dos animais tratados em ambos os estudos, se deva ao curto tempo de ação da insulina (24 horas) em função da aplicação única, quando comparado ao trabalho realizado por Simpson et al., (1994) que aplicaram insulina 2 vezes ao dia durante 5 dias.

Conclusão

A aplicação de uma única dose de insulina em vacas de corte não afeta o diâmetro do folículo ovulatório, níveis de progesterona e taxa de prenhez.

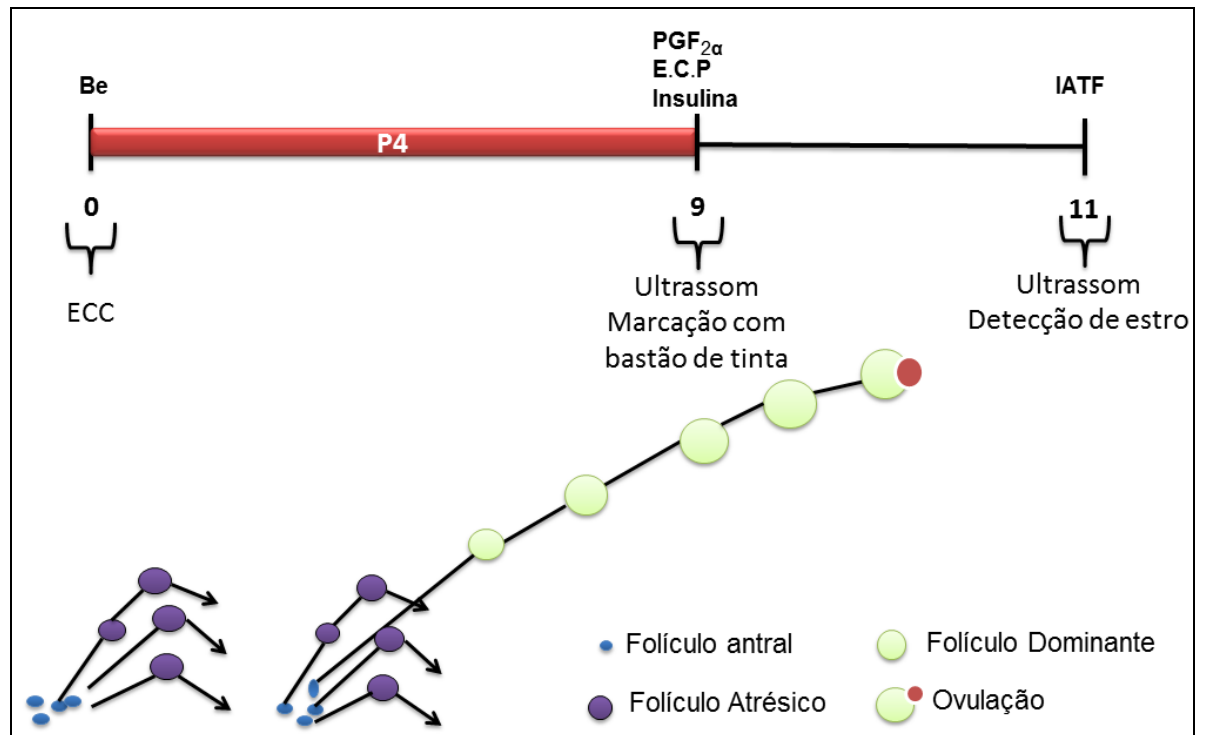
Referências

- Ambrose, J. D., et al. 1999. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. J Dairy Sci. 82: 2369-2376.
- Baruselli, P. S., E. L. Reis, M. O. Marques, L. F. Nasser, and G. A. Bo. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. Animal reproduction science 82-83: 479-486.
- Battochio, M., G. Gavia, A. Mollo, M. C. Veronesi, F. Soldano, G. Bono, F. Cairoli, F. 1999. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. Theriogenology. 51: 1059-1069.

- 918 Butler, W. R., and R. D. Smith. 1989. Interrelationships between energy balance and
919 postpartum reproductive function in dairy cattle. *Journal of dairy science* 72: 767-
920 783.
- 921 Bridges, G. A., et al. 2012. Determination of the appropriate delivery of prostaglandin F2 α in
922 the five-day CO-Synch + controlled intravaginal drug release protocol in suckled
923 beef cows *J anim sci.* 90: 4814-4822.
- 924 Colazo, M. G., and D. J. Ambrose. 2015. Effect of initial GnRH and duration of progesterone
925 insert treatment on the fertility of lactating dairy cows. *Reproduction in domestic*
926 *animals = Zuchthygiene* 50: 497-504.
- 927 DiCostanzo, A., J. E. Williams, and D. H. Keisler. 1999. Effects of short- or long-term
928 infusions of acetate or propionate on luteinizing hormone, insulin, and metabolite
929 concentrations in beef heifers. *Journal of animal science* 77: 3050-3056.
- 930 Grimard, B. et al. 1995. Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma
931 LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows.
932 *Journal of reproduction and fertility* 104: 173-179.
- 933 Lamb, G. C. et al. 2001. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and
934 prostaglandin F2 α for ovulation control in postpartum suckled beef cows.
935 *Journal of animal science* 79: 2253-2259.
- 936 Leon, H. V., J. Hernandez-Ceron, D. H. Keislert, and C. G. Gutierrez. 2004. Plasma
937 concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I, and insulin in relation to
938 changes in body condition score in heifers. *Journal of animal science* 82: 445-451.
- 939 Lucy, M. C. 2003. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows.
940 *Reprod Suppl* 61: 415-427.
- 941 Lussier, J. G., P. Matton, and J. J. Dufour. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the
942 cow. *Journal of reproduction and fertility* 81: 301-307.

- 943 Perry, G. A. 2005. Comparison of the Efficiency and Accuracy of Three Estrous Detection
944 Methods to Indicate Ovulation in Beef Cattle. Department of Animal and Range
945 Sciences 122-127.
- 946 Pfeifer, L. F. et al. 2009. Effects of low versus physiologic plasma progesterone
947 concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle.
948 Theriogenology 72: 1237-1250.
- 949 Rhodes, F. M., L. A. Fitzpatrick, K. W. Entwistle, and G. De'ath. 1995. Sequential changes in
950 ovarian follicular dynamics in Bos indicus heifers before and after nutritional
951 anoestrus. Journal of reproduction and fertility 104: 41-49.
- 952 Rostami, B. et al. 2011. Effect of eCG on early resumption of ovarian activity in postpartum
953 dairy cows. Animal reproduction science. 128: 100-106.
- 954 Santos, et al. 2016 . High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro
955 embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. Animal
956 Reproduction Science 16: 517–21.
- 957 Scanavez, A. L., C. C. Campos, R. M. Santos. 2013. Taxa de prenhez e de perda de gestação
958 em receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. Arq. Bras. Med. Vet.
959 Zootec. 65: 722-728.
- 960 Schneider, A., et al. 2010. The use of insulin to improve fertility of timed-inseminated
961 postpartum suckled beef cows. Pesq. agropec. bras. 45: 1219-1221.
- 962 Short, R. E., R.A. Bellows, R. B. Staigmiller, J. G. Berardinelli, E. E. Custer. 1990.
963 Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef
964 cattle. Journal of animal science. 68: 799-816.
- 965 Silva, E., R. A. Sterry, and P. M. Fricke. 2007. Assessment of a practical method for
966 identifying anovular dairy cows synchronized for first postpartum timed artificial
967 insemination. Journal of dairy science 90: 3255-3262.

- 968 Simpson, R. B. et al. 1994. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like
969 growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular
970 oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and
971 Brahman cows. *Journal of reproduction and fertility* 102: 483-492.
- 972 Solano, R. F., A. O. Sousa, S.H. Pereira, G. Solano, T. F. Zaynette, L. A. Chow. 2003.
973 Avaliação das perdas embrionárias em receptoras através do retorno ao estro, ultra-
974 sonografia e mensuração dos níveis plasmáticos de progesterona. *Acta Scientiae*
975 *Veterinariae* 31: 600.
- 976 Vasconcelos, J. L., R. Sartori, H. N. Oliveira, J. G. Guenther, and M. C. Wiltbank. 2001.
977 Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and
978 pregnancy rate. *Theriogenology* 56: 307-314.
- 979 Webb, R., P. C. Garnsworthy, J. G. Gong, and D. G. Armstrong. 2004. Control of follicular
980 growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of animal science* 82 E-
981 Suppl: E63-74.
- 982 Williams, G. L. 1990. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review.
983 *Journal of animal science* 68: 831-852.
- 984 Williams, G. L., O. S. Gazal, L. S. Leshin, R. L. Stanko, and L. L. Anderson. 2001.
985 Physiological regulation of maternal behavior in heifers: roles of genital stimulation,
986 intracerebral oxytocin release, and ovarian steroids. *Biology of reproduction* 65:
987 295-300.
- 988 Wiltbank, M. C., A. Gumen, and R. Sartori. 2002. Physiological classification of anovulatory
989 conditions in cattle. *Theriogenology* 57: 21-52.
- 990 Yavas, Y., and J. S. Walton. 2000. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review.
991 *Theriogenology* 54: 25-55.



992

993

Figura 1. Delineamento experimental realizado em vacas *Bos Taurus* de animais tratados com insulina (GI)

994

comparado a animais que não foram tratados com insulina (GC) durante protocolo de IATF.

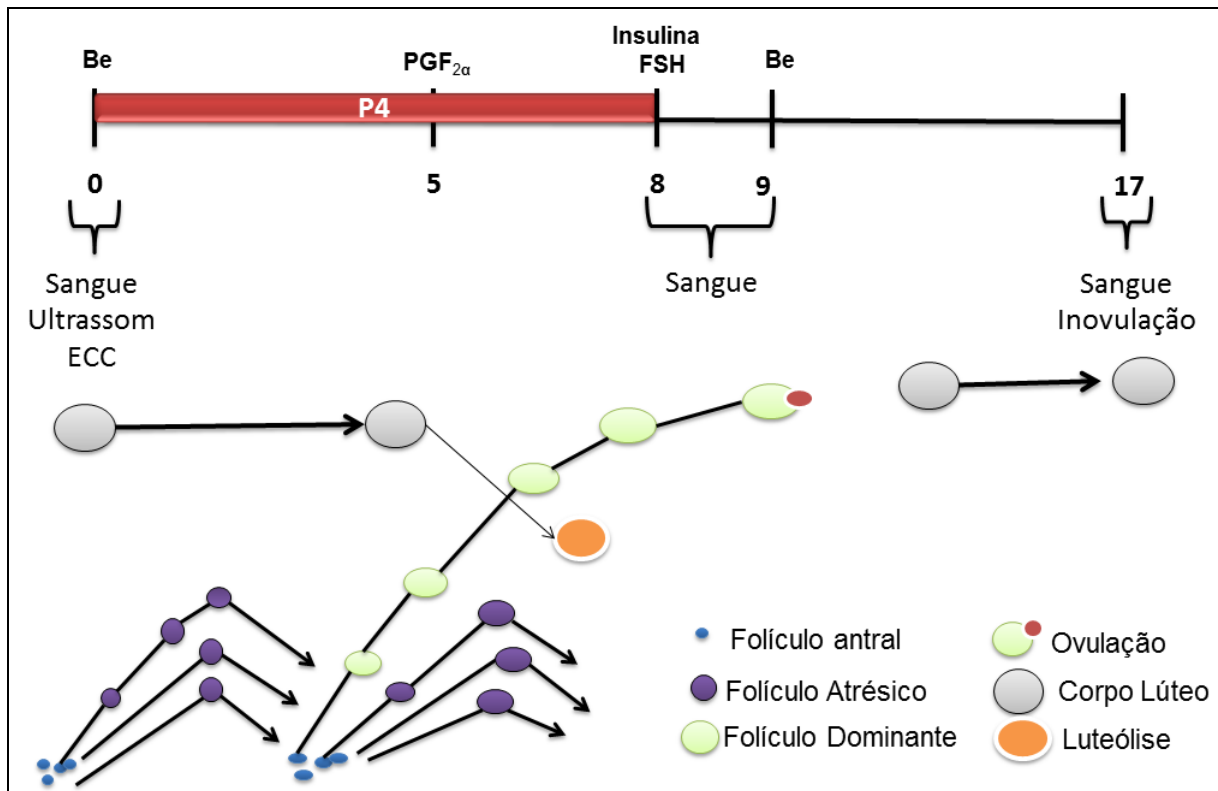
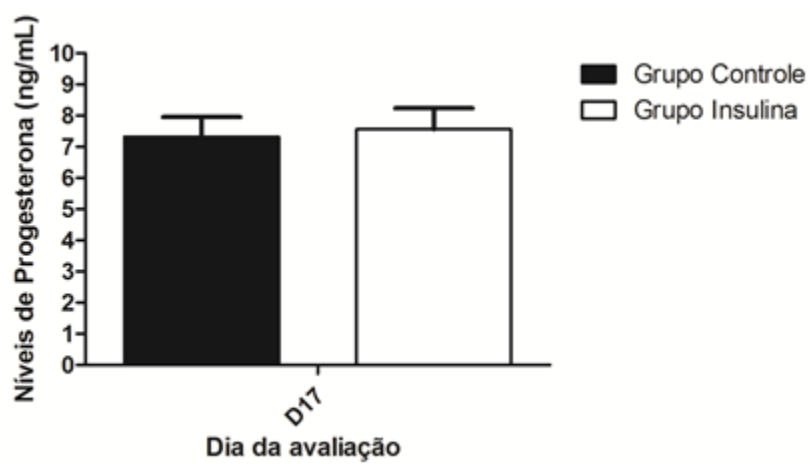


Figura 2. Delineamento experimental realizado em vacas de animais tratados com insulina (GI) comparado a animais que não foram tratados com insulina (GC) durante protocolo de TETF.

999



1000

1001 Figura 3. Níveis de P4 no dia 17 do protocolo de animais tratados com insulina (GI) comparado a animais que
1002 não foram tratados com insulina (GC) durante protocolo de TETF.

1003 Tabela 1. Descrição dos parâmetros reprodutivos avaliados ao longo do Experimento 1.

Variáveis	GC (média ± erro padrão)	GI (média ± erro padrão)	P
Diâmetro D9 (mm) (71)	11,28± 0,23	11,45± 0,23	0,80
Diâmetro D11(mm) (71)	12,20± 0,23	11,80± 0,52	0,54
Crescimento folicular (mm) (71)	0,91± 0,32	0,33± 0,32	0,20
Apresentação de cio (%) (215)	82,6 (90/109)	69,8 (74/106)	0,02
Taxa de prenhez (%) (215)	42,3(41/97)	35,7(35/98)	0,64

1004 5 CONCLUSÃO GERAL

1005

1006 A aplicação em dose única de insulina não foi capaz de incrementar o
1007 diâmetro do folículo ovulatório, esteroidogênese e área lútea de vacas leiteiras
1008 desafiadas metabólicamente. Não exercendo ação também sobre o diâmetro
1009 folicular e taxa de prenhez de vacas de corte desafiadas metabolicamente e na
1010 produção de progesterona de vacas de corte em adequada condição corporal.

6 REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T.J., & MIYAMOTO, A. (2004). Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal reproduction science*. 82(83). p. 127-140.
- ADAMS, G.P., MATTERI, R.L., KASTELIC, J.P., KO, J.C., and GINTHER, O. J. (1992). Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of reproduction and fertility*. 94. p. 177-188.
- AMSTERDAM, A., MAY, J.V. , SCHOMBERG, D.W. (1988) Synergistic effect of insulin and follicle-stimulating hormone on biochemical and morphological differentiation of porcine granulosa cells in vitro. 39(2) . p. 379-90.
- ARGOV, N., ARAV, A., SKLAN, D. (2004). Number of oocytes obtained from cows by OPU in early, but not late lactation increased with plasma insulin and estradiol concentrations and expression of mRNA of the FSH receptor in granulosa cells. *Theriogenology*. 61(5). p. 947–962.
- AUGUSTIN, R., POCAR, P., WRENZYCKI, C., NIEMANN, H., FISCHER, B. (2003). Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. *Reproduction*. 126. p.91–99.
- AUSTIN, E.J. et al. (2001). Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biology of reproduction*. 64. p. 839-848.
- BARUSELLI, P.S., REIS, E.L., MARQUES, M.O., NASSER, L.F., BO, G.A. (2004). The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal reproduction science*. 82(83). p. 479-486.
- BAUMAN, D.E. & CURRIE, W. B. (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of dairy science*. 63. p.1514-1529.
- BAUMAN, D.E. (2000). Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeoresis. In: Ruminant physiology. Digestion, metabolism, growth and reproduction (ed. P.B. Cronjé), p.311-328.
- BEG, M.A., BERGFELT, D.R., KOT, K., WILTBANK, M.C., GINTHER, O.J. (2001) . Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of reproduction*. 64. p. 432-441.
- BELFIORE, A., FRASCA, F., PANDINI, G., SCIACCA, L., VIGNERI, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine reviews*. 30. p. 586-623.
- BERGH, C., OLSSON J.H., SELLESKOG, U., HILLENSJO, T. (1993). Steroid production in cultured thecal cells obtained from human ovarian follicles. *Human reproduction*. 8. p. 519-524.
- BHATIA, B. & PRICE, C.A. (2001). Insulin alters the effects of follicle stimulating hormone on aromatase in bovine granulosa cells in vitro. *Steroids*. 66. p. 511-519.
- BRISTOL-GOULD, S.K. et al. (2006). Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. *Developmental biology*. 298. p. 132-148.

- BUTLER, W.R. & SMITH, R.D. (1989). Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *Journal of dairy science*. 72. p.767-783.
- BYRNE, A.T., SOUTHGATE, J., BRISON, D.R., LEESE, H.J. (2002). Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Molecular Reproduction and Development*. 62. p. 489-495
- CARVALHEIRA, J.B.C., ZECCHIN, H.G. SAAD, M.J.A. 2002. Vias de Sinalização da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 46(4). p. 419-425.
- CHEATHAM, B. et al. (1996). Insulin-stimulated translocation of GLUT4 glucose transporters requires SNARE-complex proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93. p. 15169-15173.
- COLAZO, M.G. & AMBROSE, D.J. (2015). Effect of initial GnRH and duration of progesterone insert treatment on the fertility of lactating dairy cows. *Reproduction in domestic animals*. 50. p. 497-504.
- DEROUEN, S.M. et al. (1994). Prepartum body condition and weight influences on reproductive performance of first-calf beef cows. *Journal of animal science*. 72. p.1119-1125.
- DRIANCOURT, M.A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55. p. 1211-1239.
- EL-ROEIY, A. et al. (1993). Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products in the human ovary. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 77. p. 1411-1418.
- EL-ROEIY, A. et al. (1994). Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 78. p.1488-1496.
- EVANS, A.C., KOMAR, C.M., WANDJI, S.A., FORTUNE, J.E. (1997). Changes in androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated with the recruitment and growth of ovarian follicles during the luteal phase of the bovine estrous cycle. *Biology of reproduction*. 57. p. 394-401.
- FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., EVANS, A.C., TURZILLO A.M. (2001). Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of reproduction*. 65. p. 648-654.
- FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., YANG, M.Y. (2004). Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal reproduction science*. 82(83). p. 109-126.
- FRICKE, P. M. et al. (1997). Effect of gonadotropin treatment on size, number, and cell proliferation of antral follicles in cows. *Domestic animal endocrinology*. 14. p. 171-180.
- GARNSWORTHY, P.C., FOULADI-NASHTA, A.A., MANN, G.E., SINCLAIR, K.D. and WEBB, R. (2009) Effect of dietary-induced changes in plasma insulin concentrations during the early postpartum period on pregnancy rate in dairy cows. *Reproduction*. 137. p. 759-768.
- GARNSWORTHY, P.C. and WEBB, R. (1999) The Influence of nutrition on fertility in dairy cows. In *Recent Advances in Animal Nutrition - 1999* (Eds P.C. Garnsworthy and J. Wiseman), pp 39-57, Nottingham University Press, Nottingham.

- GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., BEG, M. A., KOT, K. (2001). Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biology of reproduction*. 64. p. 197-205.
- GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M., GIBBONS, J.R., KOT, K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of reproduction*. 55. p. 1187-1194.
- GONG, J.G. et al. (1996). Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biology of reproduction*. 55. p. 68-74.
- GONG, J.G., BRAMLEY, T., Webb, R. (1991). The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biology of reproduction*. 45. p. 941-949.
- GONG, J.G., LEE W.J., GARNSWORTHY, P.C., WEBB, R. (2002). Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction*. 123. p. 419-427.
- GONZÁLEZ, F.H.D. & SILVA, S.C. (2006). Introdução à bioquímica clínica veterinária. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 357p.
- GOUGEON, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine reviews*. 17. p. 121-155.
- GRIMARD, B. et al. (1995). Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. *Journal of reproduction and fertility*. 104. p. 173-179.
- GUPTA, V., THAKUR, M.S., AGRAWAL, R.G., QUADRI, M.A., SHUKLA, S.N. (2010). Effect of pretreatment with insulin on ovarian and fertility response In true anestrus buffaloes to gonadotrophin-releasing hormone. *Buffalo bulletin*. 29(3). p.172-179.
- GUTIERREZ, C.G., OLDHAM, J., BRAMLEY, T.A., et al. (1997). The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *Journal of Animal Science*. 75. p.1876-84.
- GUTIERREZ, J.P., NIETO, B., PIQUERAS, P., IBANEZ, N., SALGADO, C. (2006). Genetic parameters for canalisation analysis of litter size and litter weight traits at birth in mice. *Genetics, selection, evolution GSE*, 38. p. 445-462.
- HARRISON, L.M., & RANDEL R.D. (1986). Influence of insulin and energy intake on ovulation rate, luteinizing hormone and progesterone in beef heifers. *Journal of animal science*. 63. p. 1228-1235.
- HAVRANKOVA, J., ROTH. J., BROWNSTEIN, M. (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*. 272. p. 827-829.
- HAYIRLI, A., GRUMMER, R.R., NORDHEIM, E. CRUMP, V. P. M. (2002). Animal and Dietary Factors Affecting Feed Intake During the Prefresh Transition Period in Holsteins. *J. Dairy Sci*. 85:3430-3443.
- HESS, B.W., LAKE, S.L., SCHOLLJEGERDES, E.J., WESTON, T.R., NAYIGIHUGU, V., MOLLEAND, J.D.C., MOSS, G.E. (2005). Nutritional controls of beef cow reproduction. *American Society of Agronomy*. 83(13). p. 90-106.
- INGVARTSEN, K.L., ANDERSEN, J.B. (2000) Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J Dairy Sci*. 83(7). p. 1573-97.

- 1158 KANITZ, W., BRÜSSOW, K., BECKER, F., TORNER, H., TOMEK, F., WOLFGANG.
1159 (2001). Comparative Aspects of Follicular Development, Follicular and Oocyte
1160 Maturation and Ovulation in Cattle and Pigs. *Arch. Tierz.* 44. p. 9-23.
- 1161 LAWRENCE, M.C., MCKERN, N.M., WARD, C.W. (2007). Insulin receptor structure
1162 and its implications for the IGF-1 receptor. *Current opinion in structural*
1163 *biology*. 17. p. 699-705.
- 1164 LEE V.H. (2000) Expression of rabbit zona pellucida-1 messenger ribonucleic acid
1165 during early follicular development. *Biol Reprod.* 63. p.401-408.
- 1166 LEON, H.V., HERNANDEZ-CERON, J., KEISLERT, D.H., GUTIERREZ, C.G. (2004).
1167 Plasma concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I, and insulin in
1168 relation to changes in body condition score in heifers. *Journal of animal*
1169 *science*. 82. p. 445-451.
- 1170 LEROY, J.L. et al. (2005). Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows
1171 and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro.
1172 *Reproduction*. 130. p. 485-495.
- 1173 LUSSIER, J.G., MATTON, P., DUFOUR, J.J. (1987). Growth rates of follicles in the
1174 ovary of the cow. *Journal of reproduction and fertility*. 81. p. 301-307.
- 1175 MARKSTROM, E., SVENSSON, E., SHAO, R., SVANBERG, B., BILLIG, H. (2002).
1176 Survival factors regulating ovarian apoptosis dependence on follicle
1177 differentiation. *Reproduction*. 123. p. 23-30.
- 1178 MARTINEZ, M.L., VERNEQUE, R.S., TEODORO, R.L., PIMENTEL, A.A.,
1179 FERREIRA, W.J. (1999). Análise Comparativa de Procedimentos
1180 Metodológicos para a Avaliação Genética de Vacas para a Produção de Leite.
1181 *Rev. bras. zootec.* 28(3). p. 495-503.
- 1182 MATSUI, M., TAKAHASHI, Y., HISHINUMA, M., KANAGAWA, H. (1995) Stimulatory
1183 effects of insulin on the development of bovine embryos fertilized in vitro.
1184 *Journal of Veterinary Medical Science*. 57. p. 331–336.
- 1185 MIHM, M. et al. (2000). Identification of potential intrafollicular factors involved in
1186 selection of dominant follicles in heifers. *Biology of reproduction*. 63. p. 811-
1187 819.
- 1188 MIHM, M. et al. (2006). Molecular evidence that growth of dominant follicles involves
1189 a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in
1190 luteinizing hormone dependence in cattle. *Biology of reproduction*. 74. p.
1191 1051-1059.
- 1192 PANTALEON, M., HARVEY, M.B., PASCOE, W.S., JAMES, D.E., KAYE, P.L.
1193 (1997). Glucose transporter GLUT3: ontogeny, targeting, and role in the
1194 mouse blastocyst. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
1195 *United States of America*. 94. p. 3795-3800.
- 1196 PERRY, G. A. 2005. Comparison of the Efficiency and Accuracy of Three Estrous
1197 Detection Methods to Indicate Ovulation in Beef Cattle. *Department of Animal*
1198 *and Range Sciences*. p.122-127.
- 1199 PFEIFER, L.F. et al. (2009). Effects of low versus physiologic plasma progesterone
1200 concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle.
1201 *Theriogenology*. 72. p. 1237-1250.
- 1202 PORETSKY, L. et al. (1984). Specific insulin binding sites in human ovary. *The*
1203 *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 59. p. 809-811.
- 1204 PORETSKY, L., GRIGORESCU, F., SEIBEL, M., MOSES, A.C., FLIER, J.S. (1985).
1205 Distribution and characterization of insulin and insulin-like growth factor I
1206 receptors in normal human ovary. *The Journal of clinical endocrinology and*
1207 *metabolism*. 61. p. 728-734.

- 1208 QIU, J. et al. (2014). Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via
1209 activation of canonical transient receptor potential channels. *Cell metabolism*.
1210 19. p. 682-693.
- 1211 QIU, X., DOWLING, A.R., MARINO, J.S., FAULKNER, L.D., BRYANT, B., BRÜNING,
1212 J.C., ELIAS, C.F., HILL, J.W. (2013). Delayed puberty but normal fertility in
1213 mice with selective deletion of insulin receptors from Kiss1 cells.
1214 *Endocrinology*. 154(3). p. 1337-48.
- 1215 ROCHE, J.F. (1996). Control and regulation of folliculogenesis - a symposium in
1216 perspective. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1. p. 19-27.
- 1217 SARTORELLI, E.S., CARVALHO, L.M., BERGFELT, D. R., GINTHER, O. J.,
1218 BARROS, C. M. (2005). Morphological characterization of follicle deviation in
1219 Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*. 63. p. 2382-2394.
- 1220 SARTORI, R., FRICKE, P.M., FERREIRA, J.C., GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C.
1221 (2001). Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine
1222 follicles. *Biology of reproduction*. 65. p. 1403-1409.
- 1223 SASAKI, S. (2002). Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants.
1224 *Animal Science Journal*. 73(6). p. 423-433.
- 1225 SAVIO, J.D. et al. (1993). Effects of induction of low plasma progesterone
1226 concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular
1227 turnover and fertility in cattle. *Journal of reproduction and fertility*. 98. p. 77-84.
- 1228 SCHNEIDER, A., PFEIFER, L.F.M., SCHMITT, E., BIANCHI, I., VIEIRA, M.B.,
1229 XAVIER, E. G., DEL PINO, F. A. B., CORRÊA, M. N. (2010). The use of
1230 insulin to improve fertility of timed-inseminated postpartum suckled beef cows.
1231 *Pesq. agropec. bras*. 45(10). p.1219-1221.
- 1232 SHIMIZU, T. et al. (2008). Involvement of insulin and growth hormone (GH) during
1233 follicular development in the bovine ovary. *Animal reproduction science*. 106.
1234 p. 143-152.
- 1235 SHORT, R.E., BELLOWS, R.A., STAIGMILLER, R.B., BERARDINELLI, J.G.,
1236 CUSTER, E.E. (1990). Physiological mechanisms controlling anestrus and
1237 infertility in postpartum beef cattle. *Journal of animal science*. 68. p. 799-816.
- 1238 SILVA, J.M., & PRICE C.A. (2000). Effect of follicle-stimulating hormone on steroid
1239 secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450
1240 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in
1241 vitro. *Biology of reproduction*. 62. p. 186-191.
- 1242 SIMPSON, R. B. et al. (1994). Effect of exogenous insulin on plasma and follicular
1243 insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity,
1244 follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated
1245 Angus and Brahman cows. *Journal of reproduction and fertility*. 102. p. 483-
1246 492.
- 1247 SIROIS, J. & FORTUNE J.E. (1988). Ovarian follicular dynamics during the estrous
1248 cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of*
1249 *reproduction*. 39. p. 308-317.
- 1250 SPICER, L.J., ALPIZAR, E., ECHTERNKAMP, S.E. (1993). Effects of insulin, insulin-
1251 like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation,
1252 progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth
1253 factor I production in vitro. *Journal of animal science*. 71. p. 1232-1241.
- 1254 TENA-SEMPERE, M. & HUHTANIEMI, I. (2003). Gonadotropins and gonadotropin
1255 receptors. In: Reproductive Medicine – Molecular, Cellular and Genetic
1256 Fundamentals (ed. B. C. J. M. Fauser), pp. 225-244. Parthenon Publishing,
1257 New York.

- 1258 VAN DEN HURK, R. & ZHAO J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their
1259 growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*
1260 63. p. 1717-1751.
- 1261 VAN HOUTEN, M., POSNER, B.I., KOPRIWA, B.M., BRAWER, J.R. (1980). Insulin
1262 binding sites localized to nerve terminals in rat median eminence and arcuate
1263 nucleus. *Science*. 207. p. 1081-1083.
- 1264 VASCONCELOS, J.L., SARTORI, R., OLIVEIRA, H.N., GUENTHER, J.G.,
1265 WILTBANK M.C. (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces
1266 subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*. 56. p. 307-314.
- 1267 VOLP, A.C.P., REZENDE, F.A.C., ALFENAS, R.C.G. (2008). Insulina: mecanismo de
1268 ação e a homeostase metabólica. *Rev. Bras. Nut. Clín.* 23(2). p. 158-64.
- 1269 WEBB, R. et al. (2003). Mechanisms regulating follicular development and selection
1270 of the dominant follicle. *Reprod Suppl.* 61. p. 71-90.
- 1271 WEBB, R., GARNSWORTHY, P.C., CAMPBELL, B.K., HUNTER, M. G. (2007). Intra-
1272 ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm
1273 animals. *Theriogenology*. 68(1). p. 22-29.
- 1274 WEBB, R., GARNSWORTHY, P.C., GONG, J.G., ARMSTRONG, D.G. (2004).
1275 Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal*
1276 *of animal science*. 82. p. 63-74.
- 1277 WERTHER, G. A. et al. (1987). Localization and characterization of insulin receptors
1278 in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and
1279 computerized densitometry. *Endocrinology*. 121. p. 1562-1570.
- 1280 WHITE, M. F. (1996). The IRS-signalling system in insulin and cytokine action.
1281 Philosophical transactions of the Royal Society of London. *Series B, Biological*
1282 *sciences*. 351. p. 181-189.
- 1283 WILLIAMS, G. L. (1990). Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a
1284 review. *Journal of animal science* 68: 831-852.
- 1285 WILTBANK, M.C., GUMEN, A., SARTORI, R. (2002). Physiological classification of
1286 anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*. 57. p. 21-52.
- 1287 YANG, X. et al. (1998). Control of oocyte maturation in cows-biological factors.
1288 *Theriogenology*. 49. p. 471-482.