

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 Tonello 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 Tonello 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 Tonello dos, coorient. IV. Título.

CDD : 636.2

Elaborada por Maria Beatriz Vaghetti 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 Tonello 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 holandês. 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 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, Playback, 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-opiomelacortina

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 Artigo 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 1 INTRODUÇÃO GERAL

2 A reprodução animal constitui-se em um dos fatores de maior importância
3 dentro da bovinocultura e afeta diretamente a eficiência e a rentabilidade do sistema
4 (Hess et al., 2005). Em vacas leiteiras o Balanço Energético Negativo (BEN), é o
5 fator chave relacionado à reduzida eficiência reprodutiva. Esse desequilíbrio
6 energético ocorre devido o pico de produção de leite que se dá semanas antes ao
7 pico da Ingestão da Matéria Seca (IMS), sendo que nas últimas semanas pré-parto
8 devido a fatores hormonais e anatômicos já se observa um decréscimo da IMS
9 (Bauman & Currie, 1980, Hayirli et al., 2002), que só retorna aos níveis normais a
10 partir da terceira semana pós-parto. Com isso, a energia necessária para
11 manutenção e produção de leite é superior à capacidade de ingestão e absorção de
12 energia através da alimentação, promovendo alterações metabólicas e ocasionando
13 uma redução da eficiência reprodutiva (Butler & Smith, 1989). O BEN caracteriza-se
14 metabolicamente pelo aumento das concentrações sanguíneas de NEFA e Beta-
15 hidroxibutirato (BHBA), enquanto as concentrações de fator de crescimento
16 semelhante à insulina- I (IGF-I), glicose e insulina estão baixas (Gutierrez et al.,
17 2006). Leon et al., (2004) observaram uma relação direta entre perda de condição
18 corporal e redução dos níveis circulantes de insulina, IGF-I e hormônio do
19 crescimento (GH), sendo que a alteração nos níveis sanguíneos dessas substâncias
20 está geralmente associada ao comprometimento da função ovariana e fertilidade
21 (Leroy et al., 2005), pois ocasionam um decréscimo na liberação de hormônio
22 luteinizante (LH) (Butler & Smith, 1989, Williams, 1990, DeRouen et al., 1994,
23 Wiltbank et al., 2002) comprometendo o crescimento folicular e ovulação (Grimard et
24 al., 1995).

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

34 Uma das alternativas para minimizar o efeito do anestro pós-parto, reduzindo
35 o intervalo parto concepção e os dias em aberto, é o emprego de biotecnologias
36 reprodutivas que visam à sincronização da ovulação a partir de protocolos
37 hormonais. O maior desafio ainda é encontrado quando essas biotécnicas são
38 empregadas em animais com baixa condição corporal, devido à relação desse
39 parâmetro com o diâmetro do folículo dominante. Em bovinos *Bos Taurus* segundo
40 Pfeifer et al., (2009) folículos menores que 13 mm apresentam redução da taxa de
41 prenhez e da produção de progesterona quando transformados em Corpo Lúteo
42 (CL), e folículos menores que 11 mm ocasionam maiores perdas embrionários (Perry
43 et al., 2005). Em bovinos leiteiros, sabe-se que a indução a ovulação de folículos <
44 11,5 mm, gera CL pequenos que secretam baixos níveis de progesterona
45 (Vasconcelos et al., 2001) e vacas que ovularam folículos com 14mm tiveram
46 melhores taxas de prenhez e maior produção de progesterona pelo CL (Vasconcelos
47 et al., 2001, Colazo & Ambrose, 2015).

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

66 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

67

68 2.1 Foliculogênese em bovinos

69

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

78 O processo de foliculogênese pode ser dividido nas fases pré-antral e antral,
79 onde a regulação de cada fase é complexa e envolve fatores endócrinos, parácrinos
80 e autócrinos, que controlam diversos processos (Silva & Price, 2000, Webb et al.,
81 2003, Acosta & Miyamoto, 2004, Fortune et al., 2004).

82

83 2.1.1 Fase Pré- antral

84

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

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

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

107

108 **2.1.2 Fase Antral**

109

110 Na fase antral, os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais,
111 com o crescimento e a organização das células da granulosa em várias camadas,
112 ocorrendo a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro. A partir
113 deste estágio, o diâmetro folicular aumenta acentuadamente devido à multiplicação
114 das células da granulosa, da teca e ao aumento do fluido antral (Driancourt, 2001).
115 Nesta fase, os folículos passam a ser dependentes de hormônios hipofisários, sendo
116 que até a fase de divergência folicular, o FSH apresenta-se como o principal
117 hormônio para o crescimento, que ocorre em ondas sincronizadas (Adams et al.,
118 1992, Fricke et al., 1997, Fortune et al., 2001). Em bovinos, os intervalos
119 interovulatórios apresentam 2 ou 3 ondas foliculares sempre precedidas pelo
120 aumento dos níveis de FSH (Sirois & Fortune, 1988, Adams et al., 1992).

121 A partir do diâmetro de 6 e 9 mm ocorre o processo de divergência em *Bos*
122 *Indicus* e *Bos Taurus* respectivamente que é associado com um aumento na
123 concentração folicular de estradiol (Gong et al., 1996, Roche, 1996, Mihm et al.,
124 2000, Fortune et al., 2001), redução na dependência de FSH (Mihm et al., 2006)
125 associado a um aumento na expressão do gene para o receptor de LH (Beg et al.,
126 2001) nas células da granulosa. O aumento do nível de estradiol gerado pelo folículo
127 dominante diminui a expressão e a estabilidade do gene que codifica a subunidade
128 beta do FSH (Roche, 1996), com isso gerando uma diminuição dos níveis
129 plasmáticos desse hormônio (Evans et al., 1997, Austin et al., 2001) e inibindo a
130 capacidade esteroidogênica dos folículos subordinados, com consequente início do
131 processo de atresia via apoptose (Ginther et al., 1996). Já o folículo dominante, com
132 o aumento do diâmetro folicular passa a adquirir receptores funcionais de LH e
133 consequentemente maior capacidade ovulatória (Sartori et al., 2001) sendo que a

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

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

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

158

159 **2.2 Ação da insulina sobre o sistema reprodutivo de bovinos**

160

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

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

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

182 Além de atuar no hipotálamo, interagindo com neurotransmissores
183 envolvidos no mecanismo de controle da fome-saciedade (Volp et al., 2008), a
184 insulina também desempenha um importante papel na sinalização reprodutiva tanto
185 a nível hipotalâmico quanto gonadal, demonstrando sua ação neuroendócrina na
186 reprodução (Werther et al., 1987). Pesquisas relatam presença de receptores de
187 insulina no hipotálamo, (Havrankova et al., 1978, Van Houten et al., 1980) em
188 neurônios que expressam o GnRH (Werther et al., 1987) e estudos genômicos
189 sugerem que a eliminação seletiva de receptores de insulina em neurônios KISS1,
190 neurônios que modificam a atividade neuronal de GnRH para iniciar a puberdade e
191 manter a fertilidade, causou atraso da maturidade púbere em ratos (Qiu et al., 2013).
192 Outras populações neuronais, no qual a insulina induz respostas excitatórias são os
193 Pró-opiomelanocortina (POMC), responsáveis pela produção de peptídeos que
194 desempenham ações sobre a ingestão de alimentos e atividade sexual (Qiu et al.,
195 2014).

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

201 al., 1994, el-Roeiy et al., 1994, Shimizu et al., 2008). Um estudo cultivando células
202 da granulosa e da teca *in vitro*, de folículos de diferentes estágios de
203 desenvolvimento, demonstrou expressão de receptores de insulina em todas as
204 fases, com maior quantidade em folículos dominantes pré- ovulatórios (Shimizu et
205 al., 2008). Além disso, o número de receptores para insulina foi aumentado com a
206 adição de FSH (Shimizu et al., 2008). A adição de insulina aos meios de cultivo de
207 células da granulosa promoveu aumento no número de células, na produção de
208 progesterona e de estrogênio (Spicer et al., 1993), e quando associada com o FSH,
209 incrementou a atividade da aromatase em folículos pequenos (2-4 mm) (Maio &
210 Schomberg 1981, Amsterdam et al., 1988, Gutierrez et al., 1997, Bhatia & Price,
211 2001), sendo que doses elevadas de insulina promoveu estímulo independente da
212 presença de FSH (Bhatia & Price, 2001). E a adição de insulina em meios de cultivo
213 de células da teca, estimulou a produção de andrógenos (Bergh et al., 1993). As
214 ações da insulina também foram testadas na produção *in vitro* de embriões (PIV), e
215 sua adição ao meio de cultivo aumentou o número de células do embrião (18%),
216 taxa de clivagem (6%), número de blastocistos (33%) e reduziu o número de células
217 apoptóticas, demonstrando um potencial efeito mitogênico e antiapoptótico
218 (Augustin, 2003). Byrne et al., (2002) também observaram uma diminuição
219 significativa no índice apoptótico com o uso desse hormônio, porém não houve
220 diferenças nas taxas de desenvolvimento embrionário e no número de células.
221 Efeitos benéficos da insulina sobre o desenvolvimento de embriões bovino foram
222 observados apenas quando o meio de cultura foi suplementado com glicose (Matsui
223 et al., 1995). Como a ação da insulina está fortemente relacionada à presença de
224 glicose no meio (Pantaleon et al., 1997), a ausência ou diferentes concentrações de
225 glicose no meio pode ser uma das razões dos diferentes resultados em pesquisas
226 com produção *in vitro* de embriões bovinos (Augustin, 2003).

227 Estudos realizados *in vivo* demonstram que a insulina é um fator importante
228 para o sistema reprodutor, pois permite que o ovário recupere a atividade cíclica
229 pós-parto. Gong et al., (2002) demonstraram que a oferta de dieta alto amido até os
230 50 dias pós-parto aumentou a circulação de insulina e incrementou o número de
231 vacas cíclicas antes dos 50 dias pós parto, de 55% para 90%, sem alterar a
232 produção de leite e o balanço de energia. A utilização de insulina em protocolos de
233 indução a ciclicidade em búfalas em anestro exerceu efeito positivo sobre a
234 retomada da atividade ovariana, apresentação de cio e taxa de ovulação (Gupta et

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

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

259 **3 HIPÓTESE E OBJETIVOS**

260

261 **3.1 Hipótese**

262

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

265

266 **3.2 Objetivo Geral**

267

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

270

271 **3.3 Objetivos Específicos**

272

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

280 4 CAPÍTULOS

281

282 4.1 Manuscrito 1– Avaliação do crescimento folicular de vacas da raça holandês

283 desafiadas metabolicamente e tratadas estrategicamente com insulina

284 Andressa Stein Maffi*, Joabel Tonellotto dos Santos*, Cassio Cassal Brauner*, Eduardo

285 Gularte Xavier†, Marcio Nunes Corrêa *

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

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

288 Manuscrito submetido à revista *Journal of animal Science*

289 Resumo

290 A privação de energia reduz a frequência de pulsos de hormônio luteinizante,
291 prejudicando o crescimento, maturação folicular e a ovulação. O objetivo desse estudo foi
292 avaliar o efeito da utilização estratégica de insulina como um co-fator energético durante
293 protocolo de IATF, sobre o crescimento folicular de vacas da raça holandês pós-parto,
294 desafiadas metabolicamente. Foram utilizadas 21 vacas primíparas da raça holandês entre 2 e
295 3 anos de idade com aproximadamente 70 dias em lactação, manejados em um sistema semi-
296 extensivo. No dia 0 do protocolo realizou-se a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol e
297 inserção de um dispositivo de liberação lenta de progesterona. Aplicação de 12.5 mg de
298 dinoprost no dia 8 e a aplicação de 2,5 mg de GnRH no dia 9 do protocolo. No 8º dia, os
299 animais foram divididos entre grupo controle (GC=9 animais) e grupo insulina (GI=12) que
300 recebeu a aplicação de 0,25 UI/kg de insulina. Avaliações do diâmetro folicular e coletas de
301 sangue foram realizadas diariamente do dia 8 do protocolo até a ovulação e posteriormente 5
302 e 13 dias após ovulação para mensuração da área lútea. A partir das amostras de sangue
303 foram analisados os níveis de estradiol, progesterona, glicose e Ácidos Graxos Não
304 Esterificados. A taxa de crescimento diário, diâmetro do folículo ovulatório, e os níveis de
305 estradiol, não diferiram entre os grupos. A área lútea 5 e 13 dias após a ovulação e os níveis
306 de progesterona foram semelhantes entre os grupos, porém observou-se uma redução
307 numérica desses parâmetros da primeira para a segunda avaliação no grupo controle equato o
308 grupo insulina apresentou um aumento numérico. Com isso concluímos que a aplicação de
309 uma única dose de insulina não foi capaz de incrementar o diâmetro do folículo, produção de
310 estradiol, área lútea e produção de progesterona.

311 **Palavras Chave.** bovinos, diâmetro folicular, metabolismo, reprodução

312 **Introdução**

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

320 Uma nova onda folicular se inicia entre 5-7 dias após o parto, em resposta a
321 concentrações plasmáticas de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) elevadas, e
322 independentemente do Balanço Energético Negativo (BEN) um folículo começa a crescer
323 (Butler et al., 2003). Entretanto, nem sempre este folículo produz estradiol (E_2) suficiente a
324 ponto de induzir uma onda pré-ovulatória de Hormônio Luteinizante (LH). Essa falha na
325 ovulação das primeiras ondas pós-parto tem sido relacionada com o momento mais acentuado
326 do BEN (Butler, 2000). A privação de energia reduz a frequência de pulsos de LH,
327 prejudicando assim o crescimento e maturação folicular e a ovulação (Butler & Smith, 1989,
328 Canfield et al., 1990, Beam & Butler, 1997, 1998, Silva et al., 2007), e com isso aumentando
329 os dias em aberto (Butler & Smith, 1989, Nebel & McGilliard, 1993, Snijders et al., 2001).

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

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

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

353 **Material e métodos**

354 Animais

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

357 O trabalho foi realizado em uma propriedade leiteira localizada na cidade de Rio
358 Grande-RS, distrito do Taim, nas coordenadas geográficas $32^\circ 16' S$, $52^\circ 32' W$, no período de
359 agosto a setembro de 2015. Foram utilizadas 21 vacas primíparas da raça holandês, entre 2 e
360 3 anos de idade com aproximadamente 70 dias em lactação e produção média de 20 litros/dia.
361 Os animais foram manejados em um sistema semi-extensivo sendo ordenhadas duas vezes ao
362 dia e recebendo após cada ordenha uma dieta total.

363 Tratamento hormonal

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

377 Avaliação ultrassonográfica

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

388 Coletas de sangue

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

396 Análises bioquímicas

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

402 Análises hormonais

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

406 Análise estatística

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

412 **Resultados e discussão**

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

417 Podemos observar uma redução ($P= 0,01$) dos níveis circulantes de glicose 12 horas
418 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)
419 (Figura 2 A), com retorno dos seus níveis 24 horas após. Esse efeito deve-se ao estímulo da
420 insulina à entrada de glicose nos tecidos (Vernon, 1989). Desta forma, pôde-se comprovar
421 que a utilização da insulina neste experimento realizou sua função fisiológica. Além disso,
422 no decorrer das avaliações os níveis de glicose (Figura 2 A) se mantiveram dentro dos valores
423 fisiológicos para a espécie, que é de 45 à 74,88 mg/dL (Kaneco et al., 1997, Lago et al.,
424 2004). Em relação aos níveis de NEFA (Figura 2 B) os animais de ambos os grupos
425 apresentaram um comportamento semelhante ($P=0,30$), com valores dentro do fisiológico que
426 é $\leq 0,7$ mmol/L em vacas lactantes (Corrêa et al., 2010). Não encontramos uma relação dos
427 níveis de NEFA (Figura 2 B) com o ECC (Figura 2 C), pois ao avaliarmos o ECC dos
428 animais de ambos os grupos, ao longo dos manejos observamos que estes apresentaram uma
429 perda de condição corporal significativa do dia 0 e 8 (ECC 2,3) em relação aos dias 10 (ECC
430 2,0) 15 (ECC 1,9) e 23 (ECC 2,1) ($P\leq 0,001$), indicado um quadro de catabolismo, e isso nos
431 leva a acreditar que os baixos níveis de NEFA se devam a pouca deposição de gordura que os
432 animais já apresentavam no início das avaliações (Figura 2 C).

433 O crescimento do folículo dominante entre o dia 8 e 10 (GC $1,61\pm 0,21$ mm GI
434 $0,81\pm 0,22$ mm) (Figura 3 A $P=0,11$) não foi influenciado pelo maior transporte de glicose
435 para os tecidos 12 horas após a aplicação insulina no GI (Figura 2 A), e a taxa de crescimento
436 diária também foi semelhante ($P=0,11$) entre o GC $0,53\pm 0,21$ mm e o grupo insulina
437 $0,26\pm 0,22$ mm, porém, inferior ao encontrado por outros pesquisadores (Rodhes, 1995,

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

447 O diâmetro folicular do folículo dominante não foi incrementado pelo tratamento
448 (Figura 3 A $P = 0,27$). Porém, ao avaliarmos o diâmetro folicular, independente do grupo,
449 observamos um incremento significativo ($P \leq 0,001$) do diâmetro folicular entre o dia 8
450 ($11,39 \pm 0,15$ mm) e 10 ($12,60 \pm 0,15$ mm). Esse crescimento reflete o aumento das células
451 foliculares e a capacidade esteroidogênica do folículo. Porém, mesmo com esse crescimento
452 entre o dia 8 e 10, o diâmetro do folículo pré-ovulatório de ambos os grupos de nosso estudo,
453 foi inferior ao relatado por outros autores (Peters & Benboulaid, 1998, Colazo & Ambrose,
454 2015) e isso refletiu no número de animais que tiveram capacidade de ovular. Dos 17 animais
455 acompanhados 10 ovularam, sendo 5/9 do GC e 5/8 do GI representando 55,5% e 62,5%
456 respectivamente. As vacas do GI e GC ovularam em um intervalo de 24 a 48 horas após a
457 aplicação do indutor de ovulação GnRH, sendo semelhante ao padrão de ovulação encontrado
458 no estudo de Peters & Benboulaid, (1998).

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

463 foi inferior aos 16,1 mm encontrado por Colazo & Ambrose, (2015) e entre 15 e 20 mm por
464 Peters & Benboulaid, (1998). Folículos de menor diâmetro apresentam menor capacidade
465 ovulatória, pois esse evento está associado com a aquisição de receptores de LH nas células
466 da granulosa no momento da divergência folicular (Xu et al., 1995). Acreditamos que o
467 menor diâmetro do folículo dominante das vacas ovulatórias de nosso estudo (Tabela 1)
468 quando comparado aos estudos realizados por outros pesquisadores, seja também
469 consequência da perda de condição corporal ao longo das avaliações. A aplicação de uma
470 única dose de insulina não foi capaz de minimizar os efeitos supressores do baixo ECC e
471 incrementar o diâmetro do folículo ovulatório. O diâmetro do folículo dominante das vacas
472 anovulatórias ($11,3 \pm 0,63$ mm), como esperado, foi menor ($P=0,02$) comparado às vacas
473 ovulatórias ($13,45 \pm 0,53$ mm), porém não foi diferente entre os grupos (GC $11,2 \text{ mm} \pm$
474 $1,01$ mm e GI $11,5 \text{ mm} \pm 1,01$ mm) ($P=0,87$).

475 Os níveis de E_2 sanguíneo não diferiram na média do período avaliado ($P=0,44$)
476 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, $P=0,45$).
477 As concentrações de estradiol- 17β aumentam com o crescimento dos folículos (Rahman et
478 al., 2008), devido ao aumento do número de células da granulosa e a atividade da aromatase
479 (Khan et al., 2012, Kor, 2013). Em nosso estudo como o diâmetro folicular em ambos os
480 grupos foi similar e o crescimento foi em uma taxa pequena os níveis se mantiveram
481 semelhantes ao longo das avaliações. Folículos com diâmetro reduzido resultam em menores
482 concentrações de E_2 (Vasconcelos et al., 2001, 2009) que reflete na apresentação de cio
483 (Perry et al, 2014).

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

488 Eger et al., 1988), e está relacionada a produção inadequada de E_2 pelo folículo pré-
489 ovulatório, levando a uma inadequada inibição dos receptores de ocitocina no útero (Mann &
490 Lamming, 2000). Apesar de não ter sido detectada diferença ($P=0,30$), o GC apresentou uma
491 redução numérica da área lútea da primeira para a segunda avaliação enquanto no GI ocorreu
492 um incremento numérico ($P=0,82$) desse parâmetro entre as avaliações. Diferentemente do
493 observado no GC, Rodhes, (1995) não observou alteração da área lútea em animais que
494 passaram por restrição alimentar. Essa redução da área refletiu nos níveis de P_4 (Tabela 1), os
495 quais foram semelhantes entre os grupos nas duas avaliações ($P\geq 0,05$), porém, assim como na
496 área lútea, observa-se uma redução numérica ($P=0,77$) dos níveis de P_4 da primeira para a
497 segunda avaliação no GC, devido ao fato de 3 dos 5 animais desse grupo apresentarem
498 concentrações inferiores à 1 ng/ ml, indicado luteólise. Enquanto no GI houve um
499 incremento numérico da P_4 ($P=0,15$). Essa relação entre a área lútea e a P_4 observada em
500 nosso estudo deve-se ao fato das concentrações de P_4 refletirem o crescimento, a manutenção
501 e a regressão luteal (Spano & Silva, 1992). Sendo que uma correlação positiva ($r=0,80$,
502 $P\leq 0,05$) foi encontrada em nosso estudo entre a área lútea e os níveis de progesterona no dia
503 23. Os níveis de P_4 sanguíneo de nosso estudo foram inferiores ao relatado por (Badinga et
504 al., 1994). Cinco animais, sendo 3 do GI e 2 do GC apresentaram corpo lúteo cavitário, para
505 avaliação da área lútea desses folículos, subtraiu-se o diâmetro da cavidade interna do
506 diâmetro externo do folículo. O tempo de permanência dessas cavidades depende da
507 reorganização gradual do tecido luteal e tende a desaparecer com o transcorrer do ciclo estral
508 e a presença da cavidade luteal não altera a concentração plasmática de P_4 (Kito et al., 1986).

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

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

516 **Conclusão**

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

520 **Referências**

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

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

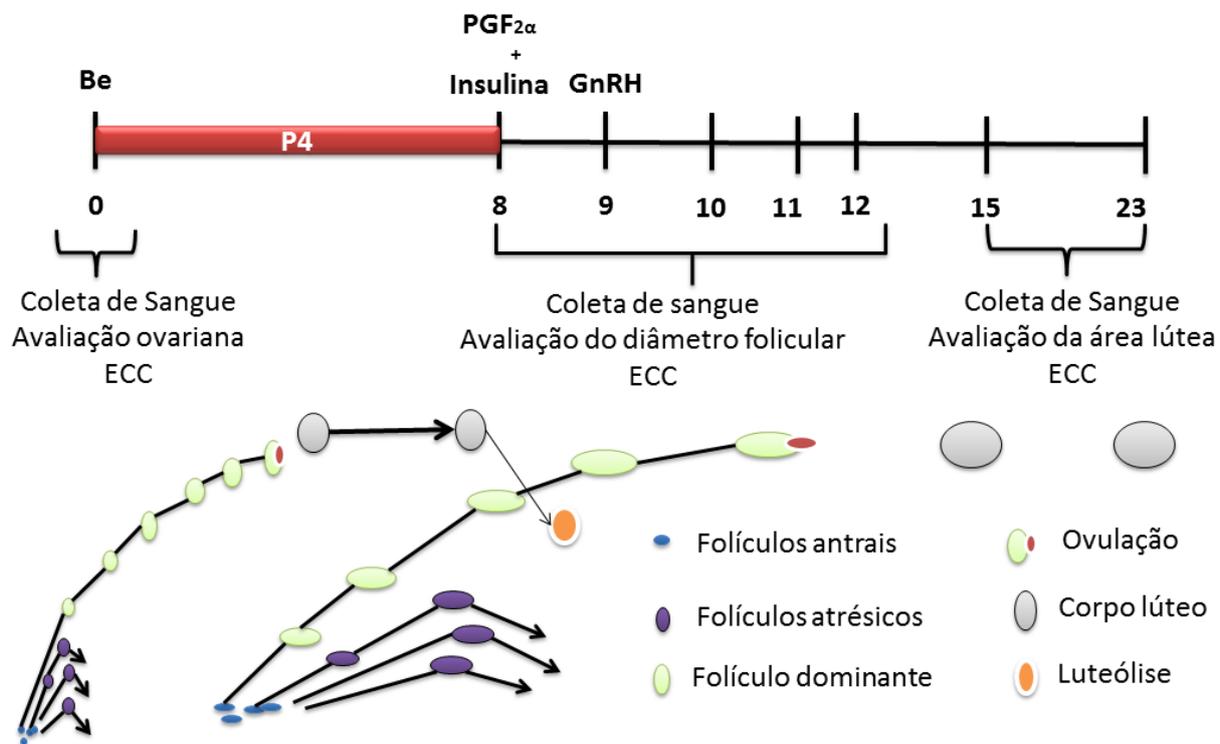
- 562 Gutierrez, C. G., J. G. Gong, T. A. Bramley, and R. Webb. 2006. Selection on predicted
563 breeding value for milk production delays ovulation independently of changes in
564 follicular development, milk production and body weight. *Animal reproduction
565 science* 95: 193-205.
- 566 Hinshelwood,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

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

- 612 Schneider, A., L. F. M. Pfeifer, E. Schmitt, I. Bianchi, M. B. Vieira, E. G. Xavier, F. A. B.
613 Del Pino, M. N. Corrêa. 2010. The use of insulin to improve fertility of timed-
614 inseminated postpartum suckled beef cows. *Pesq. agropec. bras.* 45: 1219-1221.
- 615 Shimizu, T. et al. 2008. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular
616 development in the bovine ovary. *Animal reproduction science* 106: 143-152.
- 617 Silva, E., R. A. Sterry, and P. M. Fricke. 2007. Assessment of a practical method for
618 identifying anovular dairy cows synchronized for first postpartum timed artificial
619 insemination. *Journal of dairy science* 90: 3255-3262.
- 620 Snijders, S. E. et al. 2001. Genetic merit for milk production and reproductive success in
621 dairy cows. *Animal reproduction science* 65: 17-31.
- 622 Vasconcelos, J. L., O.G. Sá Filho, G.C. Perez, A.T. Silva. 2009. Intravaginal progesterone
623 device and/or temporary weaning on reproductive performance of anestrous crossbred
624 Angus x Nelore cows. *Animal reproduction science.* 111: 302-311.
- 625 Vasconcelos, J. L., R. Sartori, H. N. Oliveira, J. G. Guenther, and M. C. Wiltbank. 2001.
626 Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and
627 pregnancy rate. *Theriogenology* 56: 307-314.
- 628 Vasconcelos, J. L. M., M. H. C. Pereira, M. Meneghetti, C. C. Dias, O.G. Sá Filho, R. F. G.
629 Peres, A. D. P. Rodrigues, Wiltbank, M. C. 2013. Relationships between growth of
630 the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. *Anim. Reprod.*
631 3: 206-214.
- 632 Vernon, R. G. 1989. Endocrine control of metabolic adaptation during lactation. *The*
633 *Proceedings of the Nutrition Society* 48: 23-32.
- 634 Webb, R., P. C. Garnsworthy, J. G. Gong, and D. G. Armstrong. 2004. Control of follicular
635 growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of animal science* 82 E-
636 Suppl: E63-74.

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

640



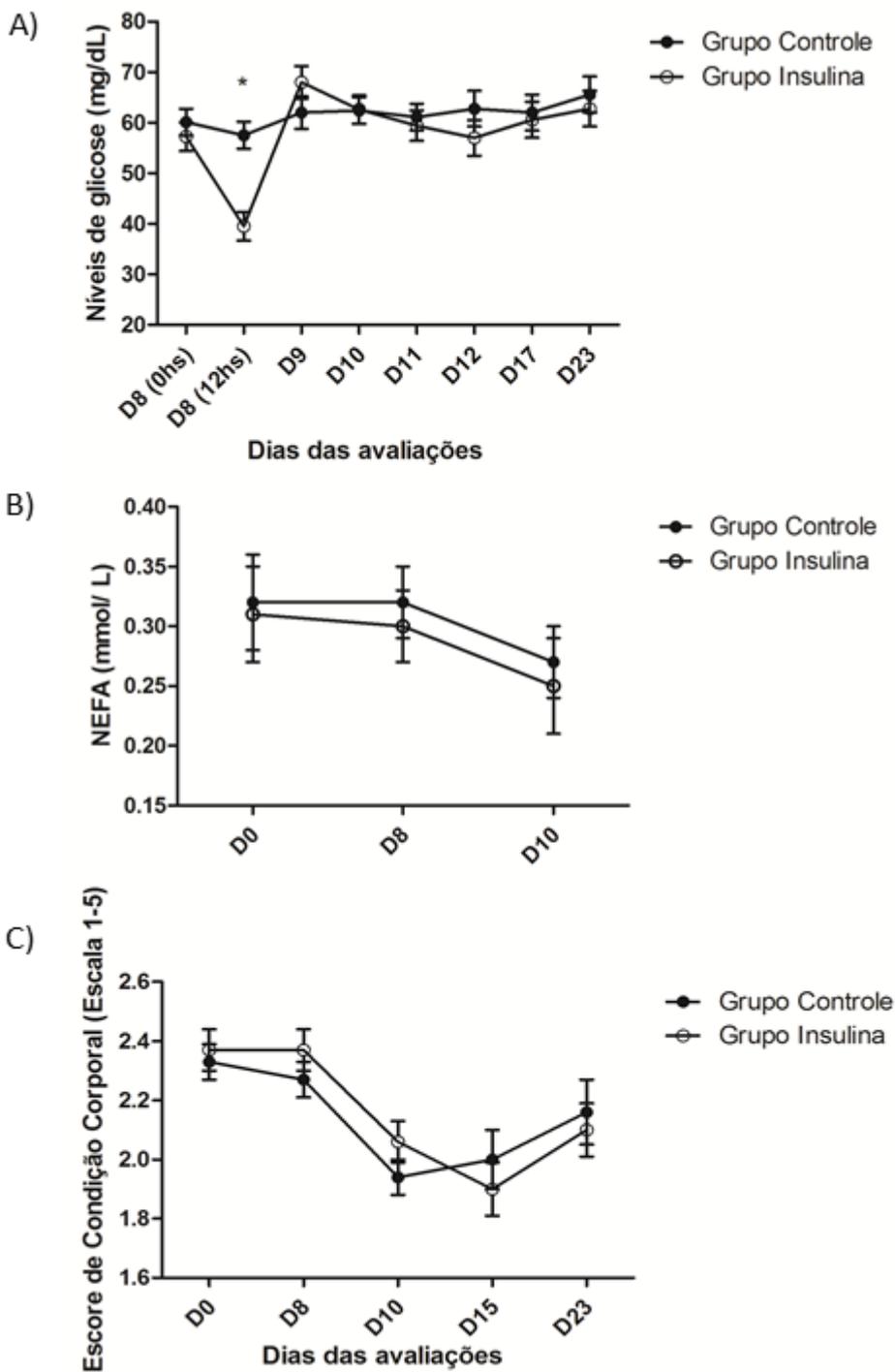
641

642

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

644 protocolo de IATF.

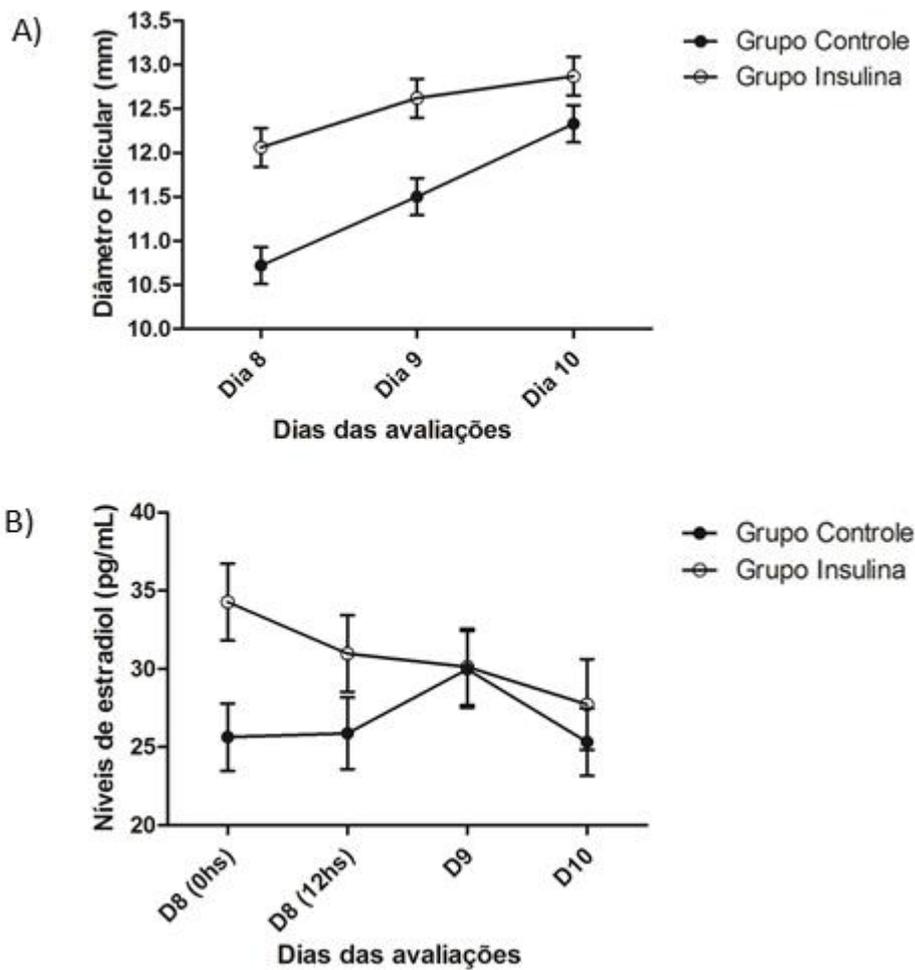
645



646

647 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
 648 os dias 0, 8, 10. C) Escore de Condição Corporal nos dias 0, 8, 10, 15 e 23 de vacas primíparas da raça holandês
 649 tratadas com Insulina (GI) durante o protocolo de IATF, comparado a animais que não receberam a aplicação de
 650 Insulina (GC).

651



652

653 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
 654 primíparas da raça holandês tratadas com Insulina (GI) durante o protocolo de IATF, comparado a animais que
 655 não receberam a aplicação de Insulina (GC)

656 Tabela 1. Parâmetros das novilhas ovulatórias da raça holandês acompanhadas durante protocolo de IATF,
 657 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

658

659 **4.2 Manuscrito 2 – Avaliação do crescimento folicular de vacas *Bos Taurus* tratadas**
660 **estrategicamente com insulina**

661 **Andressa Stein Maffi^{*}, Mityelle Chaves^{*}, Lucas Balinhas Farias^{*}, Cassio Cassal**
662 **Brauner^{*}, Joabel Tonello dos Santos^{*}, Carlos Gomes Martin[†], Marcio Nunes**
663 **Corrêa^{*}**

664 ^{*}NUPEEC, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

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

666 Manuscrito submetido à revista *Journal of Animal Science*

667 **Resumo**

668 O momento do retorno à ciclicidade após o parto determina a eficiência reprodutiva de um
669 rebanho de cria em bovinos de corte. A associação da baixa condição corporal e a
670 amamentação causam baixos níveis sistêmicos de IGF-I, insulina e glicose, modificando a
671 frequência de pulsos de LH e, conseqüentemente, comprometendo o crescimento folicular. O
672 objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação estratégica de insulina sobre o
673 crescimento folicular, produção de progesterona e taxa de prenhez em bovinos de corte.
674 Foram realizados 2 estudos, no experimento 1, 215 vacas (GC=109 GI=106) foram
675 submetidas a um protocolo que consistiu na aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol e
676 inserção de um dispositivo de liberação lenta de progesterona no dia 0 e avaliou-se o
677 crescimento folicular e a taxa de prenhez. No dia 9, procedeu-se com a remoção de P₄, a
678 aplicação de 0,5 mg de cipionato de estradiol, 12,5 mg de dinoprost e aplicação de 0,25 UI /
679 kg de insulina, nos animais tratados e no dia 11 procedeu-se com a inseminação artificial. O
680 experimento 2 foi realizado com 85 vacas (GC=49 GI=36) submetidas a um protocolo de
681 Transferência de Embrião em Tempo Fixo e avaliou-se os níveis de progesterona. No dia 0
682 fez-se aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol e a inserção de um dispositivo de liberação
683 lenta de progesterona. No 5º dia do protocolo, fez-se a aplicação de 0,150 mg de d-
684 Cloprostenol. No dia 8 fez-se a remoção do dispositivo de P₄, aplicação de 20 mg foltropina
685 de pituitária suína e de 0,25 UI / kg de insulina nos animais tratados, no dia 9 foi aplicado 1
686 mg de benzoato de estradiol e no dia 17 procedeu-se com a transferência dos embriões. No
687 experimento 1 a taxa de crescimento folicular e a taxa de prenhez foram semelhantes entre os
688 grupos (P > 0,05) e a produção de P₄ não foi diferente no experimento2. A utilização
689 estratégica de insulina em vacas de corte não altera o diâmetro do folículo ovulatório, níveis
690 de progesterona e taxa de prenhez.

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

692

693 **Introdução**

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

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

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

734 **Material e métodos**

735 Experimento 1

736 Animais

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

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

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

747 Tratamento hormonal

748 Os animais de ambas as propriedades foram submetidos a um protocolo de IATF
749 que consistiu na aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol –, 1 mg/mL⁻¹, Gonadiol[®] (Zoetis,
750 São Paulo, Brasil) e inserção de um dispositivo de liberação lenta de progesterona (P4) 1,9 g
751 de progesterona CIDR[®]–, (Zoetis, São Paulo, Brasil) no dia 0. No 9^o dia do protocolo,
752 procedeu-se com a retirada da P4, aplicação de 0,5 mg de cipionato de estradiol – i.m., 2
753 mg/mL⁻¹, E.C.P[®] –, (Zoetis, São Paulo, Brasil) e 12.5 mg de dinoprost – i.m., 5 mg/
754 mL⁻¹, Lutalyse[®] –, (Zoetis, São Paulo, Brasil) (PGF₂α). No 11^o dia do protocolo realizou-se a
755 inseminação artificial (IA). A divisão dos animais entre grupo tratado com insulina (n=106) e
756 grupo controle (n= 109) foi realizada no 9^o dia do protocolo homogeneamente a partir do
757 diâmetro do folículo dominante e ECC. As vacas do grupo tratado receberam a aplicação de
758 0,25 UI/ kg de insulina, Novolin N[®] –, (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) via subcutânea.

759 Parâmetros avaliados

760 O ECC foi avaliado no dia 0 do protocolo, em uma escala de 1 a 5 (Moraes et al.
761 2007), (onde 1 = muito magro e 5 = muito gordo) nos 215 animais, além disso todos os
762 animais foram marcados na garupa com bastão marcador no dia 9 para identificação dos
763 animais que apresentaram cio que foi realizada no 11^o dia do protocolo através da presença
764 ou ausência da tinta na garupa e 30 dias após a IA fez-se o diagnóstico de gestação com
765 auxílio de ultrassom Welld Wed-3000V Vet, acoplado a uma probe linear 7,5 MHz, inserida
766 via transretal. A avaliação do diâmetro do folículo dominante foi realizado apenas nos 71
767 animais da propriedade 1 através de ultrassom Welld Wed-3000V Vet, acoplado a uma probe

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

770 Experimento 2

771 Animais

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

782 Protocolo Hormonal

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

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

800 Parâmetros avaliados

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

807 Coletas de sangue

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

813 Análises hormonais

814 Foi realizada avaliação dos níveis de progesterona no dia 17 do protocolo de TETF de
815 39 animais (GC, n:21; GI, n:18), através de quimiluminescência com Kit para avaliação de

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

818 Análise estatística

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

825 **Resultados e discussão**

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

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

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

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

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

867 animais pelo diâmetro folicular em maior ou menor que 11mm. A taxa de prenhez dos
868 animais com folículos maiores de 11 mm foram semelhantes numericamente entre os grupos
869 GI (68,75 % 11/16) e GC (53,33 % 8/15). Entretanto observamos um incremento numérico
870 da taxa de prenhez nos animais com folículos menores que 11mm e tratados com insulina
871 (38,89% 7/18) em relação aos animais com folículos menores que 11mm e que não
872 receberam a aplicação de insulina (17,65% 3/17). Devido ao baixo número de animais em
873 cada grupo não é possível afirmar essa relação, mas associamos essa resposta, ao estímulo
874 energético que a insulina promoveu, agindo como um sinalizador metabólico, como relatado
875 no estudo Schneider et al., (2010).

876 A taxa de utilização dos animais como receptoras de embrião avaliada no
877 experimento 2, foi semelhante ($P > 0,05$) entre os grupos GC (77,1% 37/48) e GI (78,9%
878 30/38). Acreditamos que uma das explicações para não obtermos efeito da insulina sobre a
879 taxa de utilização neste experimento tenha sido o adequado ECC (3,9) e a relação desse
880 parâmetro a níveis circulantes de insulina glicose e IGF-I (Leon et al., 2004) que se
881 relacionam a adequada liberação de LH, diâmetro do folículo ovulatório e qualidade do corpo
882 lúteo, com isso não sendo possível observar nenhum efeito da insulina, uma vez que os
883 animais não estavam passando por um período de carência nutricional.

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

893 O resultado da taxa de utilização e os níveis de P4 do estudo 2, associado aos
894 resultados encontrados por Schneider et al., (2010) onde a aplicação de insulina associada ao
895 eCG em animais em boa condição corporal não incrementou a taxa de prenhez, nos leva a
896 acreditar em um potencial efeito da insulina apenas em animais nutricionalmente desafiados.
897 Porém um número maior de pesquisas deve ser realizado e com um número maior de
898 animais, relacionando a aplicação de insulina com ECC e diâmetro folicular, para obtenção
899 de resultados mais concisos. Além disso, acreditamos que a falta de resposta dos animais
900 tratados em ambos os estudos, se deva ao curto tempo de ação da insulina (24 horas) em
901 função da aplicação única, quando comparado ao trabalho realizado por Simpson et al.,
902 (1994) que aplicaram insulina 2 vezes ao dia durante 5 dias.

903 **Conclusão**

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

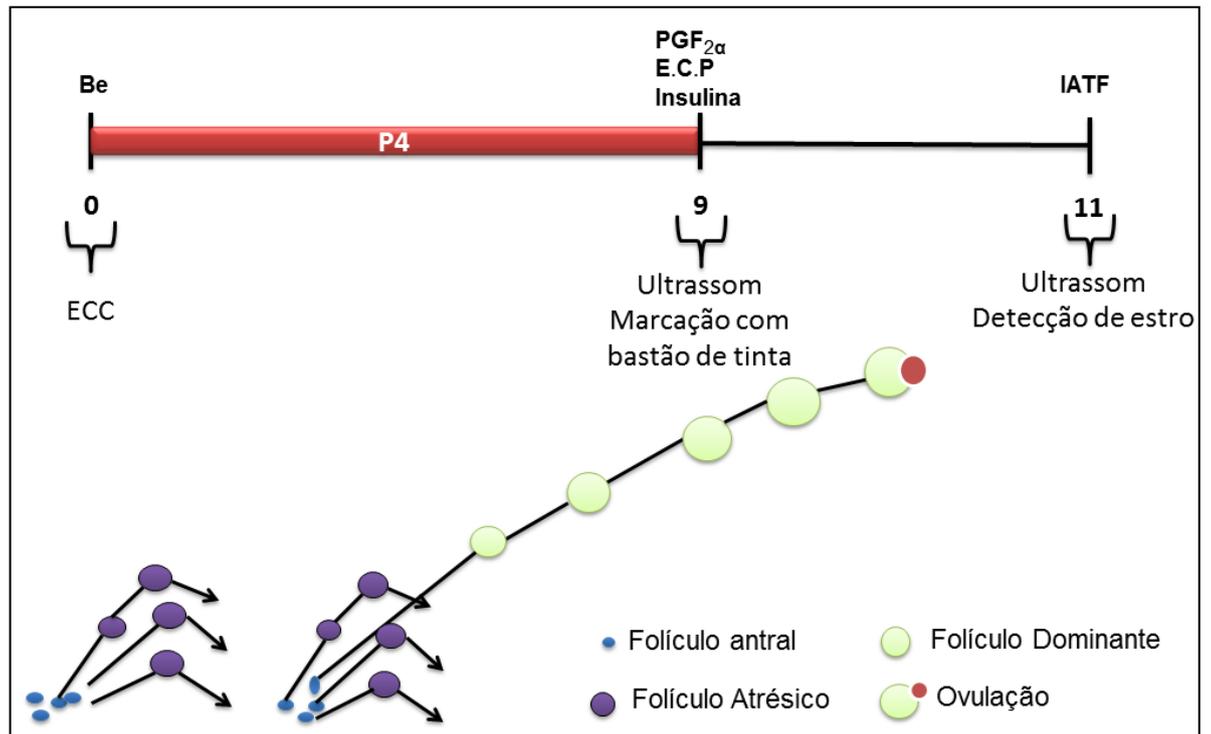
906 **Referências**

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

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

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

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

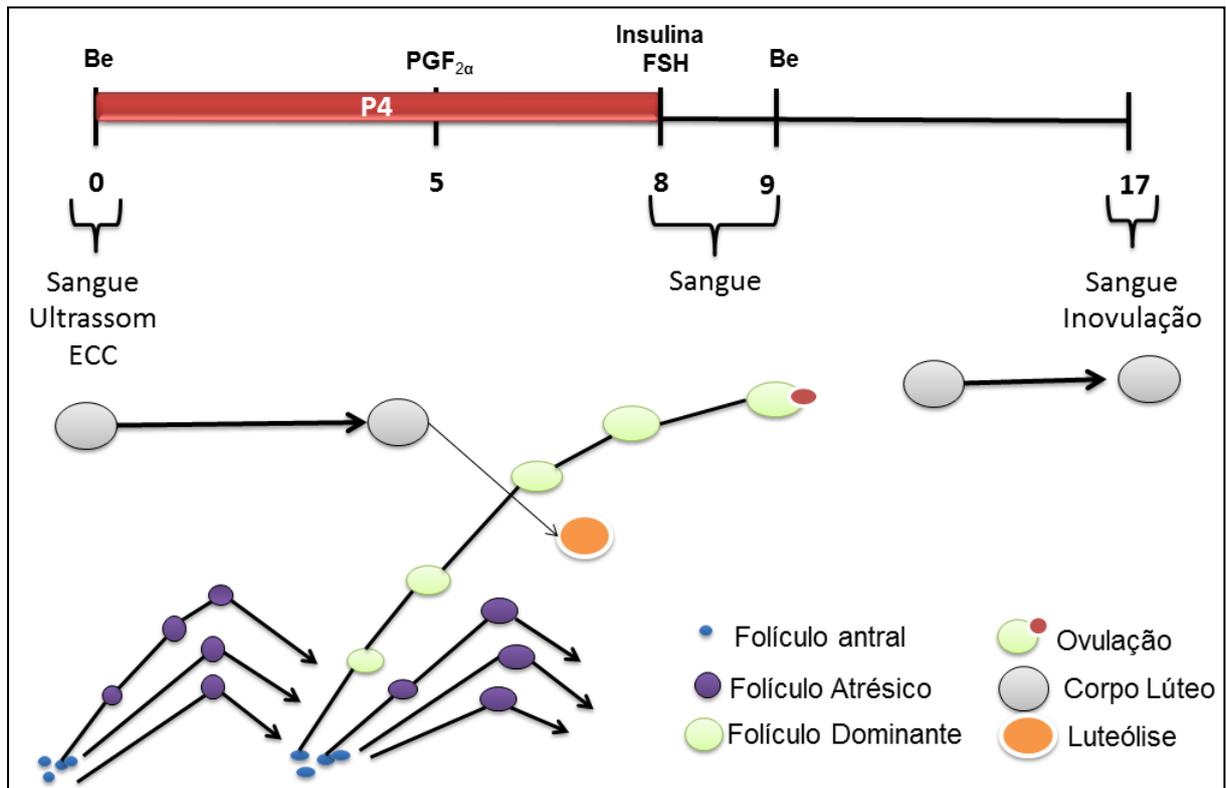


990

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

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

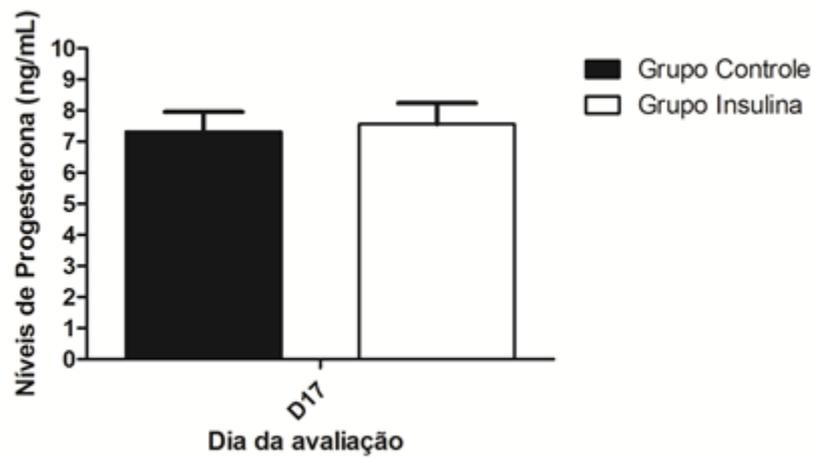
993



994

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

997



998

999 Figura 3. Níveis de P4 no dia 17 do protocolo de animais tratados com insulina (GI) comparado a animais que
1000 não foram tratados com insulina (GC) durante protocolo de TETF.

1001 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

1002 5 CONCLUSÃO GERAL

1003

1004 A aplicação em dose única de insulina não foi capaz de incrementar o
1005 diâmetro do folículo ovulatório, esteroidogênese e área lútea de vacas leiteiras
1006 desafiadas metabólicamente. Não exercendo ação também sobre o diâmetro
1007 folicular e taxa de prenhez de vacas de corte desafiadas metabolicamente e na área
1008 lútea e produção de progesterona de vacas de corte em adequada condição corporal.

1009 **6 REFERÊNCIAS**

1010

- 1011 ACOSTA, T.J., & MIYAMOTO, A. (2004). Vascular control of ovarian function:
1012 ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal reproduction*
1013 *science*. 82(83). p. 127-140.
- 1014 ADAMS, G.P., MATTERI, R.L., KASTELIC, J.P., KO, J.C., and GINTHER, O. J.
1015 (1992). Association between surges of follicle-stimulating hormone and the
1016 emergence of follicular waves in heifers. *Journal of reproduction and fertility*.
1017 94. p. 177-188.
- 1018 AMSTERDAM, A., MAY, J.V. , SCHOMBERG, D.W. (1988) Synergistic effect of
1019 insulin and follicle-stimulating hormone on biochemical and morphological
1020 differentiation of porcine granulosa cells in vitro.39(2) . p. 379-90.
- 1021 ARGOV, N., ARAV, A., SKLAN, D. (2004). Number of oocytes obtained from cows
1022 by OPU in early, but not late lactation increased with plasma insulin and
1023 estradiol concentrations and expression of mRNA of the FSH receptor in
1024 granulosa cells. *Theriogenology*. 61(5). p. 947–962.
- 1025 AUGUSTIN, R., POCAR, P., WRENZYCKI, C., NIEMANN, H., FISCHER, B.
1026 (2003). Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos
1027 produced in vitro. *Reproduction*. 126. p.91–99.
- 1028 AUSTIN, E.J. et al. (2001). Alterations in intrafollicular regulatory factors and
1029 apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine
1030 estrous cycle. *Biology of reproduction*. 64. p. 839-848.
- 1031 BARUSELLI, P.S., REIS, E.L., MARQUES, M.O., NASSER, L.F., BO, G.A. (2004).
1032 The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of
1033 anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal reproduction science*. 82(83).
1034 p. 479-486.
- 1035 BAUMAN, D.E. & CURRIE, W. B. (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy
1036 and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and
1037 homeorhesis. *Journal of dairy science*. 63. p.1514-1529.
- 1038 BAUMAN, D.E. (2000). Regulation of nutrient partitioning during lactation:
1039 homeostasis and homeoresis. In:Ruminant physiology. Digestion, metabolism,
1040 growth and reproduction (ed. P.B. Cronjé), p.311-328.
- 1041 BEG, M.A., BERGFELT, D.R., KOT, K., WILTBANK, M.C., GINTHER, O.J. (2001) .
1042 Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with
1043 follicle deviation in cattle. *Biology of reproduction*. 64. p. 432-441.
- 1044 BELFIORE, A., FRASCA, F., PANDINI, G., SCIACCA, L., VIGNERI, R. (2009).
1045 Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor
1046 receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine reviews*. 30. p. 586-
1047 623.
- 1048 BERGH, C., OLSSON J.H., SELLESKOG, U., HILLENSJO, T. (1993). Steroid
1049 production in cultured thecal cells obtained from human ovarian follicles.
1050 *Human reproduction*. 8. p. 519-524.
- 1051 BHATIA, B. & PRICE, C.A. (2001). Insulin alters the effects of follicle stimulating
1052 hormone on aromatase in bovine granulosa cells in vitro. *Steroids*. 66. p. 511-
1053 519.
- 1054 BRISTOL-GOULD, S.K. et al. (2006). Postnatal regulation of germ cells by activin:
1055 the establishment of the initial follicle pool. *Developmental biology*. 298. p.
1056 132-148.

- 1057 BUTLER, W.R. & SMITH, R.D. (1989). Interrelationships between energy balance
1058 and postpartum reproductive function in dairy cattle. *Journal of dairy science*.
1059 72. p.767-783.
- 1060 BYRNE, A.T., SOUTHGATE, J., BRISON, D.R., LEESE, H.J. (2002). Regulation of
1061 apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor
1062 (IGF) superfamily. *Molecular Reproduction and Development*. 62. p. 489-495
- 1063 CARVALHEIRA, J.B.C., ZECCHIN, H.G. SAAD, M.J.A. 2002. Vias de Sinalização da
1064 Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 46(4). p. 419-425.
- 1065 CHEATHAM, B. et al. (1996). Insulin-stimulated translocation of GLUT4 glucose
1066 transporters requires SNARE-complex proteins. *Proceedings of the National
1067 Academy of Sciences of the United States of America*. 93. p. 15169-15173.
- 1068 COLAZO, M.G. & AMBROSE, D.J. (2015). Effect of initial GnRH and duration of
1069 progesterone insert treatment on the fertility of lactating dairy cows.
1070 *Reproduction in domestic animals*. 50. p. 497-504.
- 1071 DEROUEN, S.M. et al. (1994). Prepartum body condition and weight influences on
1072 reproductive performance of first-calf beef cows. *Journal of animal science*.
1073 72. p.1119-1125.
- 1074 DRIANCOURT, M.A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm
1075 animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55. p.
1076 1211-1239.
- 1077 EL-ROEIY, A. et al. (1993). Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-
1078 II and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene
1079 products in the human ovary. *The Journal of clinical endocrinology and
1080 metabolism*. 77. p. 1411-1418.
- 1081 EL-ROEIY, A. et al. (1994). Expression of the genes encoding the insulin-like growth
1082 factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-
1083 1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary
1084 syndrome ovaries. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 78.
1085 p.1488-1496.
- 1086 EVANS, A.C., KOMAR, C.M., WANDJI, S.A., FORTUNE, J.E. (1997). Changes in
1087 androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated
1088 with the recruitment and growth of ovarian follicles during the luteal phase of
1089 the bovine estrous cycle. *Biology of reproduction*. 57. p. 394-401.
- 1090 FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., EVANS, A.C., TURZILLO A.M. (2001).
1091 Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of
1092 reproduction*. 65. p. 648-654.
- 1093 FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., YANG, M.Y. (2004). Follicular development: the role
1094 of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal
1095 reproduction science*. 82(83). p. 109-126.
- 1096 FRICKE, P. M. et al. (1997). Effect of gonadotropin treatment on size, number, and
1097 cell proliferation of antral follicles in cows. *Domestic animal endocrinology*. 14.
1098 p. 171-180.
- 1099 GARNSWORTHY, P.C., FOULADI-NASHTA, A.A., MANN, G.E., SINCLAIR, K.D.
1100 and WEBB, R. (2009) Effect of dietary-induced changes in plasma insulin
1101 concentrations during the early postpartum period on pregnancy rate in dairy
1102 cows. *Reproduction*. 137. p. 759-768.
- 1103 GARNSWORTHY, P.C. and WEBB, R. (1999) The Influence of nutrition on fertility in
1104 dairy cows. In *Recent Advances in Animal Nutrition - 1999* (Eds P.C.
1105 Garnsworthy and J. Wiseman), pp 39-57, Nottingham University Press,
1106 Nottingham.

- 1107 GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., BEG, M. A., KOT, K. (2001). Follicle selection in
1108 cattle: role of luteinizing hormone. *Biology of reproduction*. 64. p. 197-205.
- 1109 GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M., GIBBONS, J.R., KOT, K. (1996).
1110 Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of reproduction*. 55. p. 1187-
1111 1194.
- 1112 GONG, J.G. et al. (1996). Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone
1113 and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers
1114 continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biology
1115 of reproduction*. 55. p. 68-74.
- 1116 GONG, J.G., BRAMLEY, T., Webb, R. (1991). The effect of recombinant bovine
1117 somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and
1118 peripheral hormones. *Biology of reproduction*. 45. p. 941-949.
- 1119 GONG, J.G., LEE W.J., GARNSWORTHY, P.C., WEBB, R. (2002). Effect of dietary-
1120 induced increases in circulating insulin concentrations during the early
1121 postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction*. 123.
1122 p. 419-427.
- 1123 GONZÁLEZ, F.H.D. & SILVA, S.C. (2006). Introdução à bioquímica clínica
1124 veterinária. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do
1125 Sul.357p.
- 1126 GOUGEON, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts
1127 and hypotheses. *Endocrine reviews*. 17. p. 121-155.
- 1128 GRIMARD, B. et al. (1995). Influence of postpartum energy restriction on energy
1129 status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in
1130 suckled beef cows. *Journal of reproduction and fertility*. 104. p. 173-179.
- 1131 GUPTA, V., THAKUR, M.S., AGRAWAL, R.G., QUADRI, M.A., SHUKLA, S.N.
1132 (2010). Effect of pretreatment with insulin on ovarian and fertility response In
1133 true anestrus buffaloes to gonadotrophin-releasing hormone. *Buffalo bulletin*.
1134 29(3). p.172-179.
- 1135 GUTIERREZ, C.G., OLDHAM, J., BRAMLEY, T.A., et al. (1997). The recruitment of
1136 ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *Journal of
1137 Animal Science*.75. p.1876-84.
- 1138 GUTIERREZ, J.P., NIETO, B., PIQUERAS, P., IBANEZ, N., SALGADO, C. (2006).
1139 Genetic parameters for canalisation analysis of litter size and litter weight traits
1140 at birth in mice. *Genetics, selection, evolution GSE*, 38. p. 445-462.
- 1141 HARRISON, L.M., & RANDEL R.D. (1986). Influence of insulin and energy intake on
1142 ovulation rate, luteinizing hormone and progesterone in beef heifers. *Journal
1143 of animal science*. 63. p. 1228-1235.
- 1144 HAVRANKOVA, J., ROTH. J., BROWNSTEIN, M. (1978). Insulin receptors are
1145 widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*. 272. p. 827-
1146 829.
- 1147 HAYIRLI, A., GRUMMER, R.R., NORDHEIM, E. CRUMP, V. P. M. (2002). Animal
1148 and Dietary Factors Affecting Feed Intake During the Prefresh Transition
1149 Period in Holsteins. *J. Dairy Sci*. 85:3430-3443.
- 1150 HESS, B.W., LAKE, S.L., SCHOLLJEGERDES, E.J., WESTON, T.R., NAYIGIHUGU,
1151 V., MOLLEAND, J.D.C., MOSS, G.E. (2005). Nutritional controls of beef cow
1152 reproduction. *American Society of Agronomy*. 83(13). p. 90-106.
- 1153 INGVAERTSEN, K.L., ANDERSEN, J.B. (2000) Integration of metabolism and intake
1154 regulation: a review focusing on periparturient animals. *J Dairy Sci*. 83(7). p.
1155 1573-97.

- 1156 KANITZ, W., BRÜSSOW, K., BECKER, F., TORNER, H., TOMEK, F., WOLFGANG.
1157 (2001). Comparative Aspects of Follicular Development, Follicular and Oocyte
1158 Maturation and Ovulation in Cattle and Pigs. *Arch. Tierz.* 44. p. 9-23.
- 1159 LAWRENCE, M.C., MCKERN, N.M., WARD, C.W. (2007). Insulin receptor structure
1160 and its implications for the IGF-1 receptor. *Current opinion in structural*
1161 *biology.* 17. p. 699-705.
- 1162 LEE V.H. (2000) Expression of rabbit zona pellucida-1 messenger ribonucleic acid
1163 during early follicular development. *Biol Reprod.* 63. p.401-408.
- 1164 LEON, H.V., HERNANDEZ-CERON, J., KEISLERT, D.H., GUTIERREZ, C.G. (2004).
1165 Plasma concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I, and insulin in
1166 relation to changes in body condition score in heifers. *Journal of animal*
1167 *science.* 82. p. 445-451.
- 1168 LEROY, J.L. et al. (2005). Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows
1169 and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro.
1170 *Reproduction.* 130. p. 485-495.
- 1171 LUSSIER, J.G., MATTON, P., DUFOUR, J.J. (1987). Growth rates of follicles in the
1172 ovary of the cow. *Journal of reproduction and fertility.* 81. p. 301-307.
- 1173 MARKSTROM, E., SVENSSON, E., SHAO, R., SVANBERG, B., BILLIG, H. (2002).
1174 Survival factors regulating ovarian apoptosis dependence on follicle
1175 differentiation. *Reproduction.* 123. p. 23-30.
- 1176 MARTINEZ, M.L., VERNEQUE, R.S., TEODORO, R.L., PIMENTEL, A.A.,
1177 FERREIRA, W.J. (1999). Análise Comparativa de Procedimentos
1178 Metodológicos para a Avaliação Genética de Vacas para a Produção de Leite.
1179 *Rev. bras. zootec.* 28(3). p. 495-503.
- 1180 MATSUI, M., TAKAHASHI, Y., HISHINUMA, M., KANAGAWA, H. (1995) Stimulatory
1181 effects of insulin on the development of bovine embryos fertilized in vitro.
1182 *Journal of Veterinary Medical Science.* 57. p. 331–336.
- 1183 MIHM, M. et al. (2000). Identification of potential intrafollicular factors involved in
1184 selection of dominant follicles in heifers. *Biology of reproduction.* 63. p. 811-
1185 819.
- 1186 MIHM, M. et al. (2006). Molecular evidence that growth of dominant follicles involves
1187 a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in
1188 luteinizing hormone dependence in cattle. *Biology of reproduction.* 74. p.
1189 1051-1059.
- 1190 PANTALEON, M., HARVEY, M.B., PASCOE, W.S., JAMES, D.E., KAYE, P.L.
1191 (1997). Glucose transporter GLUT3: ontogeny, targeting, and role in the
1192 mouse blastocyst. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
1193 *United States of America.* 94. p. 3795-3800.
- 1194 PERRY, G. A. 2005. Comparison of the Efficiency and Accuracy of Three Estrous
1195 Detection Methods to Indicate Ovulation in Beef Cattle. *Department of Animal*
1196 *and Range Sciences.* p.122-127.
- 1197 PFEIFER, L.F. et al. (2009). Effects of low versus physiologic plasma progesterone
1198 concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle.
1199 *Theriogenology.* 72. p. 1237-1250.
- 1200 PORETSKY, L. et al. (1984). Specific insulin binding sites in human ovary. *The*
1201 *Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 59. p. 809-811.
- 1202 PORETSKY, L., GRIGORESCU, F., SEIBEL, M., MOSES, A.C., FLIER, J.S. (1985).
1203 Distribution and characterization of insulin and insulin-like growth factor I
1204 receptors in normal human ovary. *The Journal of clinical endocrinology and*
1205 *metabolism.* 61. p. 728-734.

- 1206 QIU, J. et al. (2014). Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via
1207 activation of canonical transient receptor potential channels. *Cell metabolism*.
1208 19. p. 682-693.
- 1209 QIU, X., DOWLING, A.R., MARINO, J.S., FAULKNER, L.D., BRYANT, B., BRÜNING,
1210 J.C., ELIAS, C.F., HILL, J.W. (2013). Delayed puberty but normal fertility in
1211 mice with selective deletion of insulin receptors from Kiss1 cells.
1212 *Endocrinology*. 154(3). p. 1337-48.
- 1213 ROCHE, J.F. (1996). Control and regulation of folliculogenesis - a symposium in
1214 perspective. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1. p. 19-27.
- 1215 SARTORELLI, E.S., CARVALHO, L.M., BERGFELT, D. R., GINTHER, O. J.,
1216 BARROS, C. M. (2005). Morphological characterization of follicle deviation in
1217 Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*. 63. p. 2382-2394.
- 1218 SARTORI, R., FRICKE, P.M., FERREIRA, J.C., GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C.
1219 (2001). Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine
1220 follicles. *Biology of reproduction*. 65. p. 1403-1409.
- 1221 SASAKI, S. (2002). Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants.
1222 *Animal Science Journal*. 73(6). p. 423-433.
- 1223 SAVIO, J.D. et al. (1993). Effects of induction of low plasma progesterone
1224 concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular
1225 turnover and fertility in cattle. *Journal of reproduction and fertility*. 98. p. 77-84.
- 1226 SCHNEIDER, A., PFEIFER, L.F.M., SCHMITT, E., BIANCHI, I., VIEIRA, M.B.,
1227 XAVIER, E. G., DEL PINO, F. A. B., CORRÊA, M. N. (2010). The use of
1228 insulin to improve fertility of timed-inseminated postpartum suckled beef cows.
1229 *Pesq. agropec. bras*. 45(10). p.1219-1221.
- 1230 SHIMIZU, T. et al. (2008). Involvement of insulin and growth hormone (GH) during
1231 follicular development in the bovine ovary. *Animal reproduction science*. 106.
1232 p. 143-152.
- 1233 SHORT, R.E., BELLOWS, R.A., STAIGMILLER, R.B., BERARDINELLI, J.G.,
1234 CUSTER, E.E. (1990). Physiological mechanisms controlling anestrus and
1235 infertility in postpartum beef cattle. *Journal of animal science*. 68. p. 799-816.
- 1236 SILVA, J.M., & PRICE C.A. (2000). Effect of follicle-stimulating hormone on steroid
1237 secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450
1238 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in
1239 vitro. *Biology of reproduction*. 62. p. 186-191.
- 1240 SIMPSON, R. B. et al. (1994). Effect of exogenous insulin on plasma and follicular
1241 insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity,
1242 follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated
1243 Angus and Brahman cows. *Journal of reproduction and fertility*. 102. p. 483-
1244 492.
- 1245 SIROIS, J. & FORTUNE J.E. (1988). Ovarian follicular dynamics during the estrous
1246 cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of*
1247 *reproduction*. 39. p. 308-317.
- 1248 SPICER, L.J., ALPIZAR, E., ECHTERNKAMP, S.E. (1993). Effects of insulin, insulin-
1249 like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation,
1250 progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth
1251 factor I production in vitro. *Journal of animal science*. 71. p. 1232-1241.
- 1252 TENA-SEMPERE, M. & HUHTANIEMI, I. (2003). Gonadotropins and gonadotropin
1253 receptors. In: *Reproductive Medicine – Molecular, Cellular and Genetic*
1254 *Fundamentals* (ed. B. C. J. M. Fauser), pp. 225-244. Parthenon Publishing,
1255 New York.

- 1256 VAN DEN HURK, R. & ZHAO J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their
1257 growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*
1258 63. p. 1717-1751.
- 1259 VAN HOUTEN, M., POSNER, B.I., KOPRIWA, B.M., BRAWER, J.R. (1980). Insulin
1260 binding sites localized to nerve terminals in rat median eminence and arcuate
1261 nucleus. *Science*. 207. p. 1081-1083.
- 1262 VASCONCELOS, J.L., SARTORI, R., OLIVEIRA, H.N., GUENTHER, J.G.,
1263 WILTBANK M.C. (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces
1264 subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*. 56. p. 307-314.
- 1265 VOLP, A.C.P., REZENDE, F.A.C., ALFENAS, R.C.G. (2008). Insulina: mecanismo de
1266 ação e a homeostase metabólica. *Rev. Bras. Nut. Clín.* 23(2). p. 158-64.
- 1267 WEBB, R. et al. (2003). Mechanisms regulating follicular development and selection
1268 of the dominant follicle. *Reprod Suppl.* 61. p. 71-90.
- 1269 WEBB, R., GARNSWORTHY, P.C., CAMPBELL, B.K., HUNTER, M. G. (2007). Intra-
1270 ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm
1271 animals. *Theriogenology*. 68(1). p. 22-29.
- 1272 WEBB, R., GARNSWORTHY, P.C., GONG, J.G., ARMSTRONG, D.G. (2004).
1273 Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal*
1274 *of animal science*. 82. p. 63-74.
- 1275 WERTHER, G. A. et al. (1987). Localization and characterization of insulin receptors
1276 in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and
1277 computerized densitometry. *Endocrinology*. 121. p. 1562-1570.
- 1278 WHITE, M. F. (1996). The IRS-signalling system in insulin and cytokine action.
1279 *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological*
1280 *sciences*. 351. p. 181-189.
- 1281 WILLIAMS, G. L. (1990). Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a
1282 review. *Journal of animal science* 68: 831-852.
- 1283 WILTBANK, M.C., GUMEN, A., SARTORI, R. (2002). Physiological classification of
1284 anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*. 57. p. 21-52.
- 1285 YANG, X. et al. (1998). Control of oocyte maturation in cows-biological factors.
1286 *Theriogenology*. 49. p. 471-482.