

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Somatotropina bovina: efeitos no metabolismo hepático de neonatos e desempenho produtivo e reprodutivo de vacas leiteiras

Mityelle da Costa Chaves Rodrigues

Pelotas, 2016

Mityelle da Costa Chaves Rodrigues

Somatotropina bovina: efeitos no metabolismo hepático de neonatos e desempenho produtivo e reprodutivo de vacas leiteiras

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: Metabolômica).

Orientador: Marcio Nunes Corrêa

Coorientador(es): Cássio Cassal Brauner

Carolina Bespalhok Jacometo

Pelotas, 2016

Dados de catalogação da fonte:

Elaborada por Maria Beatriz Vaghetti Vieira CRB: 10/1032

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas

R696s Rodrigues, Mityelle da Costa Chaves

Somatotropina bovina: efeitos no metabolismo hepático de neonatos e desempenho produtivo e reprodutivo de vacas leiteiras / Mityelle da Costa Chaves Rodrigues ; Marcio Nunes Corrêa, orientador ; Cássio Cassal Brauner, Carolina Bespalhok Jacometo, coorientadores. — Pelotas, 2016.

57 f. : il.

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

1. Neonatos. 2. Produção de leite. 3. Rbst. 4. Reprodução. I. Corrêa, Marcio Nunes, orient. II. Brauner, Cássio Cassal, coorient. III. Jacometo, Carolina Bespalhok, coorient. IV. Título.

CDD : 636.2

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa (Orientador)

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin

Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Dr^a Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro

Doutora em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer

Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Para minha mãe, noivo e família, com amor e gratidão.

Dedico.

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, por iluminar sempre meu caminho.

A minha mãe Sirlei da Costa Chaves por apoiar incondicionalmente em todas as escolhas da minha vida pessoal e profissional, por todos os ensinamentos, educação e amor compartilhados, pela oportunidade a qual me proporcionou de estudar e ser Médica Veterinária e por toda confiança depositada.

Ao meu noivo, amigo e companheiro Pablo Fagundes Pires Silveira por todo carinho, amor e compreensão. Agradeço estar ao meu lado nos momentos felizes e também difíceis neste período.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela oportunidade de realizar o mestrado.

A CAPES pela bolsa de estudos oferecida durante o curso.

Ao meu orientador Dr. Marcio Nunes Corrêa pela orientação, dedicação, amizade e confiança.

Ao meu coorientador Dr. Cássio Cassal Brauner pelo auxílio na elaboração desta dissertação, toda amizade e dedicação nestes dois anos de mestrado.

A minha coorientadora Dr^a. Carolina Bespalhok Jacometo pela dedicação, amizade e ensinamentos durante o mestrado.

Aos integrantes do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC) pelo auxílio na execução do projeto e pela família que construímos juntos.

Ao Laboratório de Bioquímica Clínica pela infra-estrutura e materiais para condução das atividades.

Aos meus amigos Daiana e Rodrigo, Sabrina e Artur, Raquel, Samanta, Stela e André pela amizade e companheirismo.

A minha família, em especial meu irmão Glauber, minhas cunhadas Marinalva, Poliana e Paola, meus tios e meus sogros Paulo e Vera por estarem presentes e apoiarem em todos os momentos.

A todos meus amigos que tornaram meus dias mais alegres.

Muito Obrigada!

Resumo

RODRIGUES, Mityelle da Costa Chaves. **Somatotropina bovina: efeitos no metabolismo hepático de neonatos e desempenho produtivo e reprodutivo de vacas leiteiras**. 2016. 57f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A administração de vacas com somatotropina bovina durante o peri-parto tem sido associada com possíveis efeitos benéficos sobre as adaptações fisiológicas e função hepática. O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito de diferentes momentos de aplicação de rbST no período pré-parto em vacas leiteiras sobre eficiência produtiva e reprodutiva da lactação subsequente, bem como avaliar o metabolismo hepático da progênie ao nascimento através da expressão de genes relacionados ao eixo GH-IGF-I, gliconeogênese, sinalização da insulina, captação de glicose e estresse oxidativo. Foram utilizadas 152 vacas da raça Holandês, divididas em três grupos: animais que receberam 2 doses rbST (rbST 2) ($n = 60$) nos dias -28 e -14 em relação a data do parto, animais que receberam 3 doses rbST (rbST 3) ($n = 46$), nos dias -42, -28 e -14 em relação a data do parto, e grupo controle, sem aplicação rbST (GC) ($n = 46$). Os animais tratados receberam 500 mg de rbST (Lactotropin[®], Elanco Saúde Animal, São Paulo, São Paulo) em cada aplicação. Foram realizadas coletas de dados de escore de condição corporal (ECC), intervalo entre parto concepção (IPC), produção de leite nos dias 14, 21, 28, 35, 42, 56, 70, 84 de lactação e produção leiteira total (PLT). Da progênie, foram avaliados vinte neonatos, identificados de acordo com suas mães: neonatos rbST2 (NrbST2) ($n = 9$), neonatos rbST3 (NrbST3) ($n = 7$) e neonatos GC (NGC) ($n = 4$). Foram selecionados algumas fêmeas, de acordo com a data de parição de suas mães, e submetidos à biopsia hepática 12 horas após o nascimento, para avaliação do padrão de expressão de genes relacionados ao eixo GH-IGF-I, gliconeogênese, sinalização da insulina, captação da glicose e estresse oxidativo. O rbST2 apresentaram maior produção de leite, quando comparado com GC e rbST3 no 35^a dia de lactação. Não foi encontrada diferença na produção de leite total e avaliações referentes IPC e ECC entre os grupos. Dentre os marcadores hepáticos dos neonatos, a expressão de *IGF-I*, *SLC2A2* e *CAT* foi maior no NrbST2 e no NrbST3 quando comparado ao NGC. A expressão de *GHR1A* tendeu a ser maior no NrbST3 comparado ao NGC. A expressão de *PC* foi maior no NrbST2 quando comparado ao NGC. O rbST quando utilizado no pré-parto, induziu a um aumento na produção de leite em alguns momentos da lactação. Não foi possível observar uma interação do rbST com a eficiência reprodutiva. Além disso, o tratamento com rbST nas vacas afetou o metabolismo hepático da progênie, e essas mudanças podem apresentar impactos positivos ao metabolismo dos neonatos.

Palavras-chave: Neonato, produção de leite, rbST, reprodução.

Abstract

RODRIGUES, Mityelle da Costa Chaves. **Bovine somatotropin: effects on hepatic metabolism of newborns and productive and reproductive performance of dairy cows.** 2016. 57f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The supplementation of cows with bovine somatotropin during the peripartum period has been associated with possible positive effects on physiological adaptations and hepatic function. The objective of this study was to investigate the effect of different doses of rbST in the prepartum period in dairy cows on productive and reproductive efficiency at subsequent lactation, as well as its effect on the hepatic metabolism of progeny at birth through the expression of genes related to GH-IGF-I axis, gluconeogenesis, insulin signaling, glucose uptake and oxidative stress. For this study, 152 Holstein cows were used and divided in three groups: animals that received 2 doses of rbST (rbST2) (n = 60), at days -28 and -14 related to calving, animals that received 3 doses of rbST (rbST3) (n = 46), at days -42, -28 and -14 related to calving, and control group, with no rbST application (GC) (n = 46). Treated groups received 500 mg of rbST (Lactotropin[®], Elanco Saúde Animal, São Paulo, São Paulo) in each injection. Data of body condition score data (BCS), interval between calving to conception (ICC), milk production in days 14, 21, 28, 35, 42, 56, 70, and 84 of lactation and total milk production (TMP) were evaluated. A subset of twenty calves were evaluated, identified according to their dams: newborns rbST2 (NrbST2) (n = 9), newborns rbST3 (NrbST3) (n = 7) and newborns rbST (NCG) (n = 4). Calves were submitted to liver biopsy at birth, to evaluate the expression pattern of genes related to GH-IGF-I axis, gluconeogenesis, insulin signaling, glucose uptake and oxidative stress. Cows from rbST2 had greater milk production than CG and rbST3 at 35th day of lactation. No difference was found in the total milk yield, ICC and BCS between groups. Among the markers on neonatal hepatic metabolism, the expression of *IGF-I*, *SLC2A2* and *CAT* were higher in NrbST2 and NrbST3 compared to NCG. The expression of *GHR1A* tended to be higher in NrbST3 compared to NCG. The expression of *PC* was higher in NrbST2 compared to NCG. The prepartum rbST treatment induced an increase in milk production in some moments during lactation. There was no interaction between rbST and dairy cows reproductive efficiency. In addition, maternal treatment with rbST affected the neonatal hepatic metabolism, and these changes can positively impact the newborn metabolism.

Keywords: Newborns, milk production, rbST, reproduction.

Lista de Figuras

Figura 1: Análise dos últimos 60 anos da produção de leite x reprodução	12
---	----

Lista de Abreviaturas

AGNE - Ácidos Graxos Não Esterificados

BEN - Balanço Energético Negativo

BHBA - Beta-Hidroxibutirato

ECC - Escore de Condição Corporal

GH - Hormônio do crescimento

GHR - Receptor do hormônio do Crescimento

GHR1A - Receptor 1 A do hormônio do Crescimento

IA - Inseminação Artificial

IGF-I - Fator de Crescimento Semelhante a Insulina tipo I

rbST - Somatotropina Bovina Recombinante

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Somatotropina Recombinante Bovina	13
2.2 Ação do rbST no feto	14
2.3 Uso do rbST no pré-parto com influência na reprodução e lactação subsequente	16
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS	20
3.1 Hipótese	20
3.2 Objetivo Geral	20
3.3 Objetivos Específicos	20
4 CAPÍTULOS	21
4.1 Manuscrito	21
Efeito da aplicação de rbST durante o pré-parto de vacas da raça Holandês sobre características da lactação, eficiência reprodutiva e metabolismo hepático da progênie ao nascimento	21
5 CONCLUSÃO GERAL	52
6 REFERÊNCIAS	53

INTRODUÇÃO GERAL

Segundo dados de acordo com IBGE, o Rio Grande do Sul é o segundo estado brasileiro maior produtor de leite do país, apenas atrás de Minas Gerais (9,54 bilhões de litros). A produção de leite do Rio Grande do Sul nos últimos dez anos (2004/2014) cresceu quase o dobro da brasileira: 103,39% contra 56,72%. A produção gaúcha evoluiu de 2,36 bilhões de litros para 4,80 bilhões de litros, enquanto a brasileira aumentou de 23,50 bilhões de litros para 36,83 bilhões de litros entre 2004 e 2014.

Com os novos rumos do comércio alimentício a nível nacional e internacional, e o aumento da competitividade na busca de novos mercados, a produção de alimentos, tende a buscar saídas para um crescimento em quantidade e qualidade. A intensificação nos sistemas de produção animal tem levado a um aumento do risco de aparecimento de transtornos metabólicos nos rebanhos leiteiros uma vez que o desafio metabólico imposto pela maior produtividade favorece o desequilíbrio entre o aporte de nutrientes no organismo, capacidade de metabolização desses componentes e os níveis de produção alcançados (González et al., 2000).

Nos Estados Unidos a seleção genética nos últimos 50 anos, proporcionou um crescimento exponencial na produção de leite por vaca (Hansen, 2000; Lucy, 2001). Em contrapartida, a fertilidade da vaca de alta produção vem diminuindo, ocasionando elevadas perdas econômicas nas fazendas produtoras de leite (Butler, 1998; Lucy, 2001). Segundo Mackey et al., (2007), o mérito genético para a produção de leite está negativamente associado com o desempenho reprodutivo (Figura 1).

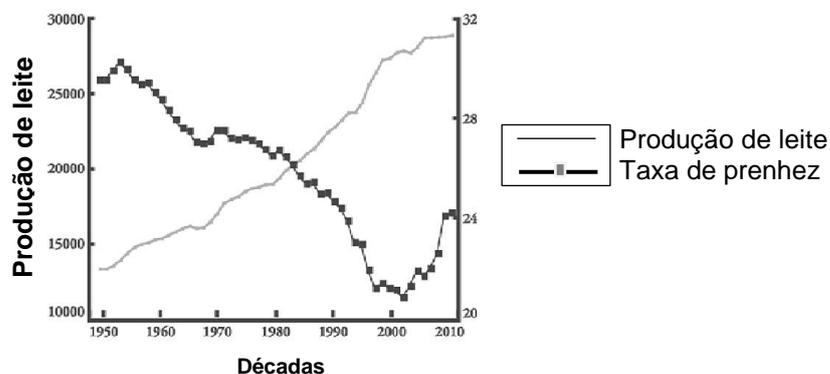


Figura 1. Análise dos últimos 60 anos da produção de leite x reprodução

Fonte: Butler, 2011 – Comunicação pessoal

O período de transição da gestação para a lactação é crítico para definir o desempenho reprodutivo de uma vaca. O retorno à atividade ovariana e a concepção em no máximo 100 dias após o parto é importante para a lucratividade de um sistema pecuário, seja de corte ou leite (Roche et al., 2000). Em vacas no terço final da gestação e início da lactação as demandas energéticas aumentam muito e ultrapassam a capacidade e/ou disponibilidade de alimento fazendo com que a mesma entre em balanço energético negativo (BEN) (Bauman e Currie, 1980).

O balanço nutricional negativo é a causa dos maiores transtornos que prejudicam a produção. Wittwer (2000) descreve que a capacidade de um animal para se ajustar a um BEN depende do volume de suas reservas corporais disponíveis. Já a adaptação a um balanço positivo depende de sua capacidade metabólica para armazenar reservas.

Segundo Beam e Butler (1998), o atraso na ovulação pós-parto está diretamente associado ao estado energético da vaca, ou seja, quanto maior o BEN, maior o tempo para retorno a ciclicidade; bem como a efeitos adversos na eficiência reprodutiva subsequente da vaca. Alguns pesquisadores sugerem que um retorno mais cedo à ciclicidade seja benéfico ao desempenho reprodutivo (Staples et al., 1990; Senatore et al., 1996; Darwash et al., 1997) devido ao aumento no número de ciclos estrais que a vaca apresenta antes da inseminação artificial (IA), esta associado à maior taxa de concepção à primeira IA (Thatcher e Wilcox, 1973).

O uso de estratégias de seleção genética, tratamentos hormonais e manejo nutricional que antecipem o momento da primeira ovulação irão beneficiar também o momento da concepção. Assim como estratégias que minimizam o BEN e a perda de escore de condição corporal (ECC) no período de pós-parto recente podem ter um impacto positivo no momento da primeira ovulação e taxa de concepção.

Existem alternativas disponíveis no mercado, com a finalidade de ajustar o metabolismo da vaca leiteira de alta produção. Uma delas, a somatotropina recombinante bovina (rbST), possui um efeito galactopoiético, o qual estimula o fluxo sanguíneo para a glândula mamária (Rodrigues et al., 2008). Segundo Bauman (1992), a administração de rbST aumenta a produção de leite, a eficiência da produção, promovendo aumentos na produção leiteira que variam de 3 – 40% e melhora a persistência da lactação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Somatotropina Recombinante Bovina

O hormônio de crescimento (GH) também conhecido como somatotropina recombinante bovina (rbST) é um hormônio homeorrético utilizado na regulação da partição de nutrientes, sendo administrado para aumentar a produção e melhorar a eficiência na síntese de leite (Gulay e Hatipoglu, 2005). Devido a esse potencial de produção gerado pelo rbST, o hormônio tem sido amplamente utilizado em vacas durante a lactação (McBride e Burton, 1989).

A rbST atua também na função reprodutiva via fator de crescimento semelhante a insulina do tipo I (IGF-I) (Willis et al., 1998) e funciona como um modulador da ação das gonadotrofinas, estimulando a proliferação das células da teca e granulosa (Armstrong; Webb, 1997), no crescimento folicular, além de ser regulador primário da produção de estradiol em bovinos (Butler et al., 2004).

Atualmente no mercado existem duas formas comerciais de somatotropina bovina, ambas utilizadas em vacas leiteiras após o pico de lactação, de liberação lenta, com intervalo de aplicação de 14 dias, por via subcutânea. As formas comerciais encontradas são Lactotropin[®] (Elanco Saúde Animal, São Paulo, São Paulo) e Boostin[®] (MSD Saúde Animal, São Paulo, São Paulo).

O uso de injeções de somatotropina no pré-parto, que tem potencial para melhorar a adaptação metabólica na transição de vacas leiteiras, têm demonstrado ter um impacto positivo no pós-parto recente e retomada da ovulação pós-parto, como já demonstrado (Schneider et al., 2012). Com isso, a suplementação de vacas com baixas doses de somatotropina (um quarto da dose – 125 mg) durante o período do peri-parto tem sido associada com possíveis efeitos benéficos sobre as adaptações fisiológicas e função hepática (Gulay et al., 2003; Gulay et al., 2004).

Logo após o parto, devido ao intenso BEN, vacas leiteiras de alta produção tem uma redução drástica no nível sanguíneo de insulina, devido a captação de glicose pela glândula mamária para a síntese de lactose (Butler et al., 2003). Esta redução sérica no nível de insulina leva a uma redução na expressão hepática do receptor do GH (GHR), especialmente o do tipo 1A (GHR1A) (Butler et al., 2003), que corresponde a 50% do GHR hepático (Jiang e Lucy, 2001). O IGF-I é produzido em

resposta à ativação do GHR pelo GH (Jones e Clemmons, 1995), com a diminuição de GHR, ocorre uma dissociação do eixo GH/IGF-I, com isso há uma redução na expressão hepática e nível circulante de IGF-I (Fenwick et al., 2008). Como consequência da redução do nível de IGF-I, o feedback negativo realizado pelo IGF-I na secreção de GH é diminuído também (Muller et al., 1999) e há um aumento no nível circulante de GH (Butler et al., 2003). Esta elevação do nível de GH é benéfica para a produção de leite, pois estimula a lipólise e aumenta a disponibilidade de glicose para a síntese de leite pela glândula mamária (Bell, 1995).

2.2 Ação do rbST no feto

As estratégias nutricionais e farmacológicas utilizadas no período de transição, além dos benefícios à vaca, podem afetar o desenvolvimento e metabolismo da prole (Gao et al., 2012). A nutrição materna inadequada ou de baixa energia durante a prenhez influencia a trajetória de crescimento fetal (McMillen et al., 2001), pois o particionamento de substratos fetais é alterado ou reduzido por mudanças de estado metabólico materno (Gao et al., 2007), o que pode comprometer o crescimento pós-natal, o metabolismo, e saúde dos animais (Gao et al., 2009; Micke et al., 2010).

O tratamento com rbST, no período seco das vacas aumenta a concentração de IGF-I no colostro, faz partição dos nutrientes para produção de colostro e redirecionamento para o feto (Pauletto et al., 2005). Hadsell et al., (1993) demonstrou que o aumento de IGF-I circulante pelo tratamento com rbST no período seco, aumentou também a transferência de IGF-I para o colostro em 40%. Nesse caso, a presença de altas concentrações de IGF-I nas secreções lácteas é relacionada também com o crescimento e desenvolvimento do recém-nascido (Grosvenor et al., 1993). Pakkanen e Aalto (1997) sugeriram que uma dieta rica em IGF-I, como o colostro, provoca o aumento do crescimento e da taxa de renovação celular das células intestinais. Desse modo, contribuindo para o estabelecimento de um intestino funcionalmente mais eficiente, aumentando a captura dos nutrientes e favorecendo processos anabólicos, bem como estimulando o crescimento.

Watchet et al., (1998), afirmam que o GH materno não atravessa a barreira placentária. Porém, segundo Burton et al., (1994), o GH pode estimular a secreção de IGF-I pelo feto. Correlações positivas já foram relatadas entre as concentrações séricas de IGF-I da mãe e feto no final da gestação (Carret et al., 1995).

Em experimento realizado por Bagaldo et al., (2007), com aplicações de rbST em vacas no período pré-parto e avaliação dos bezerros recém nascidos, que foram abatidos em diferentes momentos: após o nascimento e sem a ingestão de colostro; 48 horas (dois dias) e 168 horas (sete dias) após o nascimento. Esses bezerros receberam 5% do seu peso vivo de colostro, fornecido nas primeiras quatro horas de vida. Verificou-se que a expressão hepática de *IGF-I*, logo após o nascimento foi maior nos bezerros provenientes de mães que receberam rbST, comparada com o grupo controle.

Segundo Brolio et al., (2010), a nutrição materna durante a gestação tem uma função importante no desenvolvimento fetal e placentário, mas pouco se sabe como a nutrição materna influencia a produtividade da progênie ao longo da vida, e nos últimos anos diversos estudos vêm sendo realizados com intuito de entender melhor os mecanismos da programação fetal.

O metabolismo hepático dos neonatos mamíferos é extremamente desafiado nos primeiros dias de vida, pois, precisam se adaptar a mudanças quanto ao fornecimento de nutrientes, a nutrição é alterada da forma contínua parenteral (principalmente glicose, lactato e aminoácidos) através da placenta para uma forma descontínua de fornecimento de colostro e leite (ou sucedâneo lácteo) que possui lactose e gordura como principal fonte energética (Hammon et al., 2012). Portanto, qualquer modificação na nutrição materna durante o período pré-parto pode alterar o fluxo de nutrientes para o feto, afetando desta forma o metabolismo hepático do feto. Assim a realização de pesquisas são necessárias para esclarecer os mecanismos pelos quais a nutrição pode alterar o metabolismo hepático dos neonatos.

Estudos realizados por Gallo e Block (1990), que buscavam entender a possível influência do rbST nas filhas de vacas tratadas com o mesmo, concluiu que o rbST não alterou parâmetros bioquímicos sanguíneos e fenotípicos dos animais, ou seja, a magnitude das modificações na repartição de nutrientes produzidos por rbST, não afetaram a hierarquia do processo de particionamento para o bezerro em nível de metabolismo sistêmico.

O rbST é responsável por alterações no metabolismo da glicose, sendo esse efeito particularmente benéfico na fase final da gestação. É comum que os neonatos apresentem um estado de hipoglicemia logo após o nascimento, devido à glicose ser um nutriente vital para diversos órgãos e tecidos, e a lactose presente no colostro não ser suficiente para atender a demanda de glicose, portanto há extrema

necessidade da ativação do metabolismo gliconeogênico logo após o nascimento (Girard et al., 1992). O eixo GH-IGF-I também é importante no desenvolvimento dos neonatos, a aplicação de rbST no pré-parto em vacas leiteiras aumenta a concentração de IGF-I nas secreções lácteas esse aumento torna-se positivo no crescimento e desenvolvimento dos neonatos que ingerirem este colostro, rico em IGF-I, pois, este ativa o GH e sua ligação ao receptor GHR, o qual vai estimular a síntese de IGF-I endógeno (Jones e Clemmons, 1995).

Outro aspecto muito importante de ser estudado em neonatos é o sistema de defesa, estando diretamente relacionado com a capacidade oxidante dos neonatos, que por sua vez já demonstrou ser modulada pela nutrição materna no período pré-parto. Dieta com baixa concentração energética ofertada durante as três últimas semanas de gestação reduziu a capacidade antioxidante dos neonatos (Gao et al., 2012). E Inanami et al., (1999), sugere que a susceptibilidade dos bezerros ao estresse oxidativo, durante o período neonatal, pode ser explicada pelo sistema de defesa ainda ser imaturo contra os radicais superóxido.

2.3 Uso do rbST no pré-parto com influência na reprodução e lactação subsequente

O período de transição em vacas leiteiras é definido como três semanas antes até três semanas após o parto (Grummer, 1995). Nesta fase, as alterações fisiológicas que ocorrem durante a transição da gestação para a lactação, tem uma grande influência sobre a saúde e o desempenho da vaca durante a lactação subsequente (Drackley, 1999). Muitas vezes essas alterações acabam desencadeando o processo conhecido como BEN.

Estudos prévios reportaram uma variedade de resultados quando rbST foi administrado durante o período de transição. Segundo Gulay et al., (2003), a administração de rbST 21 dias antes da data prevista do parto até 42 dias após o parto (intervalos de duas semanas) aumentou a produção de leite. Durante os primeiros dias do tratamento de rbST, a produção leiteira aumenta gradualmente e alcança um pico, e o aumento é mantido com injeções contínuas de rbST (Bauman, 1999). Importante achado relatou que a suplementação com rbST no pré parto até a primeira semana de lactação mostrou tendência a aumentar a produção de leite (Gulay et al., 2004).

No pós-parto recente de vacas leiteiras, a duração e intensidade do BEN, o nível de perda de ECC e a produção leiteira são fortemente associados ao momento da primeira ovulação (Butler, 2003; Watheset al., 2007). Neste sentido, estratégias que minimizam o BEN e a perda de ECC no período de pós-parto recente podem ter um impacto positivo no momento da primeira ovulação e taxa de concepção.

A administração de rbST no periparto induziu um aumento nas concentrações séricas de IGF-I por até 30 dias após o parto (Gulay et al., 2004). Segundo Velazquez et al., (2008), o IGF-I circulante desempenha um papel essencial na reprodução. O IGF-I atua como regulador primário da produção de estradiol em bovinos (Butler et al., 2004). Em vacas leiteiras que ovulam precocemente, o nível de IGF-I plasmático é significativamente maior do que naquelas que apresentam atraso no retorno a ciclicidade (Butler et al., 2006; Kawashima et al., 2007), e administração de somatotropina no periparto é capaz de induzir a um aumento das concentrações sanguíneas de IGF-I (Putnam et al., 1999; Carriquiry et al., 2009; Scheneider et al., 2012). Echterkamp et al., (1990), demonstraram que a elevação nos níveis circulantes de IGF-I resultou em maiores taxas de concepção em bovinos. O nível sanguíneo de IGF-I é relacionado com o retorno à atividade ovariana pós-parto (Butler et al., 2006) e sobrevivência do embrião (Velazquez et al., 2005). Além disso, IGF-I age no crescimento e diferenciação de folículos antrais (Rivera e Fortune, 2003).

A administração de rbST resulta em aumento na taxa de gliconeogênese no fígado, aumenta a mobilização de reservas de glicogênio, diminui a oxidação da glicose e diminui o efeito inibitório da insulina na síntese de glicose no fígado (Peel e Bauman, 1987). Putnam et al., (1999), demonstraram que a aplicação de rbST em vacas leiteiras, tratados com 500 mg de rbST a cada 14 dias no pré-parto, resultou no aumento das concentrações de glicose e redução da concentração de Ácidos Graxos Não Esterificados (AGNE) e Beta-Hidroxibutirato (BHBA) no pós-parto, em comparação a animais do grupo sem tratamento. Este conjunto de fatores permite melhor adaptação metabólica e minimização do BEN de vacas no período pós-parto (Douglas et al., 2007). Gulay e seus colaboradores (2007), utilizaram rbST em vacas no período pré-parto e avaliaram diretamente e indiretamente a eficiência deste hormônio em reduzir ou prevenir a ocorrência de doenças metabólicas no pós-parto, e seus resultados indicaram que uma dose de 125mg de rbST para vacas da raça

Holandês em 3 semanas pré-parto reduziu a incidência de mastite clínica, cetose e desordens trato digestóriorelacionadas com o parto (Gulay et al.,2007).

2.4 Revisão dos genes avaliados neste estudo

Para melhor compreensão dos genes avaliados neste estudo, colocou-se uma breve revisão sobre a ação e atuação de cada um.

Na rota de gliconeogênese avaliou-se a Piruvato Carboxilase (PC), a qual está envolvida na gliconeogênese, lipogênese, secreção de insulina, síntese do neurotransmissor glutamato, e catalisa a carboxilação de piruvato à oxaloacetato (Harrey e Ferrier, 2015). As enzimas PC e a PCK1 são enzimas limitantes da velocidade da rota gliconeogênica e na utilização hepática de vários precursores, tais como propionato, lactato e glicerol (Harrey e Ferrier, 2015). O aumento das atividades *PECK1* de pré-termo a termo em bezerros de 4 dias de idade é acompanhado por um aumento da Glicogenólise e gliconeogênese, mas também, aumentando pelo armazenamento de glicogênio hepático com a idade (Steinhoff-Wagner et al., 2011b). Atividades da *G6PC* também é imprescindível na rota de gliconeogênese, seus valores são baixos no feto durante a gestação, aumenta no nascimento, tem um pico em poucos dias após o nascimento, e mantêm-se relativamente constante até a idade adulta.

O gene *SLC2A2* codifica a GLUT2. De acordo com Gorovits e Charron (2003), o GLUT-2 é expresso predominantemente nas células hepáticas e β pancreáticas. Este por sua vez, possui uma maior capacidade de transportar a glicose em situações de hiperglicemia (Mcewen e Reagan, 2004). A maior expressão *SLC2A2* está ligado com maior eficiência na captação de glicose. Segundo Steinhoff-Wagner et al., (2014), bezerros alimentados com colostro em comparação com aqueles alimentados com sucedâneo, apresentou maior eficiência na captação de glicose.

Compreender como os marcadores de estresse e inflamação mudam durante o período neonatal e são afetados pela nutrição pré-natal, pode ajudar os pesquisadores a desenvolver estratégias para amenizar a tensão inicial de nascimento (Bertoni et al., 2009).

A superóxido dismutase, juntamente com outras duas – catalase e glutathione peroxidase – são as principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos

superiores (Halliwell & Gutteridge, 1989) e a GPx é encontrada em alta atividade no fígado (Halliwell & Gutteridge, 1989). A SOD catalisa a dismutação de superóxido a H₂O₂ (Al-Gubory et al., 2010) e é a primeira defesa do organismo considerado pró-oxidantes (Halliwell e Chirico, 1993). O aumento da produção de H₂O₂ durante a fagocitose de PMNL está associada com maior expressão de SOD2 (Olsson et al., 2011).

A catalase é uma enzima antioxidante fundamental na defesa, durante o estresse oxidativo. A enzima catalase esta presente na maioria das células aeróbicas, sendo que em animais se encontra principalmente no fígado, rins e eritrócitos (Halliwell e Gutteridge, 1985). A catalase decompõe o peróxido de hidrogênio, um produto tóxico do metabolismo, em água e oxigênio molecular (Gaetani et al., 1989).

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

O uso do rbST no período pré-parto de vacas leiteiras melhora a eficiência produtiva e reprodutiva da lactação subsequente e é capaz de modular o metabolismo hepático do neonato.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da administração em diferentes momentos de rbST no periparto de vacas leiteiras sobre a eficiência produtiva e reprodutiva da lactação subsequente, bem como o metabolismo hepático da progênie ao nascimento.

3.3 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da administração de rbST nos dias 42, 28 e 14 dias pré-parto sobre a produção de leite;
- Avaliar o efeito da administração de rbST nos dias 42, 28 e 14 dias pré-parto sobre o intervalo parto-concepção.
- Avaliar a regulação do metabolismo hepático na progênie através da expressão de genes relacionados ao eixo GH-IGF1 (*IGF-I*, *GHR1A*, *IGFBP13*) gliconeogênese (*PC*, *PCK1*, *G6PC*) sinalização da insulina, captação de glicose (*IRS1*, *INSR*, *SLC2A2*) e estresse oxidativo (*CAT*, *GPX1*, *MPO*, *SOD2*), em resposta a aplicação de rbST nas mães.

4 CAPÍTULOS

4.1 Manuscrito

Efeito da aplicação de somatotropina recombinante bovina durante o pré-parto de vacas da raça Holandês sobre características da lactação, eficiência reprodutiva e metabolismo hepático da progênie ao nascimento

Artigo será traduzido e submetido à revista *Journal of Dairy Science*

Mityelle C. C. Rodrigues^{,#}, Diego A. Velasco^{*,#}, Carolina B. Jacometo^{*,#}, Cássio C. Brauner^{*,#}, Monique Costa^{*,#}, Alice Benites^{*,#}, Joao Rincon^{*,#} e Márcio N. Corrêa^{*,#}*

*Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil;

#Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

Autor Correspondente:

Marcio Nunes Corrêa

Universidade Federal de Pelotas

Campus Universitário

CEP: 96160-000

Capão do Leão – Rio Grande do Sul- Brasil

Telefone/fax: 555399839408/3222 7136

E-mail:marcio.nunescorrea@gmail.com

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito de diferentes momentos de aplicação da somatotropina recombinante bovina (**rbST**) no período pré-parto em vacas leiteiras sobre eficiência produtiva e reprodutiva, bem como avaliar os impactos no metabolismo hepático dos neonatos. Foram utilizadas 152 vacas da raça Holandês, os animais foram divididos em três grupos: grupo que recebeu 2 doses rbST (**rbST2**) ($n = 60$), grupo que recebeu 3 doses rbST (**rbST 3**) ($n = 46$) e grupo controle, sem aplicação rbST (**GC**) ($n = 46$), durante o pré-parto. Os grupos tratados receberam em cada aplicação 500 mg de rbST (Lactotropin[®], Elanco Saúde Animal, São Paulo, São Paulo). No rbST2 as aplicações foram realizadas nos dias -28 e -14 e no rbST3 nos dias -42, -28 e -14 em relação a data prevista do parto. Vinte bezerras foram identificadas para análises de acordo com suas mães: neonatos Rbst2 (**NrbST2**) ($n = 9$), neonatos **rbST3** (**NrbST3**) ($n = 7$) e neonatos GC (**NGC**) ($n = 4$). Foram selecionadas vinte bezerras pela homogeneidade de parição dos animais, estas foram submetidos a biópsia hepática 12 horas após o nascimento para avaliação do padrão de expressão de genes relacionados ao eixo GH-IGF-I, gliconeogênese, sinalização da insulina, captação da glicose e estresse oxidativo. Os animais do rbST2 apresentaram maior produção de leite, quando comparado com GC e rbST3 no 35^a dia de lactação. Não foi encontrada diferença na produção de leite total e avaliações referentes IPC e ECC entre os grupos. Dentre os marcadores do metabolismo hepático dos neonatos, a expressão de *IGF-I*, *SLC2A2* e *CAT* foram maiores no NrbST2 e no NrbST3 quando comparado ao NGC. A expressão de *GHR1A* tender a maior no NrbST3 comparado ao NGC. A expressão de *PC* foi maior no NrbST2 quando comparado ao NGC. O rbST quando utilizado no pré-parto, induz a um aumento na produção de leite em alguns momentos da lactação. Não foi possível observar um efeito do rbST com o intervalo parto-concepção. Além disso, o tratamento com rbST nas vacas afetou o metabolismo hepático da progênie, e essas mudanças podem apresentar impactos positivos ao metabolismo dos neonatos.

Palavras-chave: Neonato, produção de leite, rbST, reprodução.

INTRODUÇÃO

Durante o período de transição de vacas leiteiras, diversas alterações hormonais, metabólicas, fisiológicas e anatômicas que preparam a vaca para o parto e lactogênese favorecem a ocorrência de diversos distúrbios patológicos que podem, além de prejudicar a eficiência produtiva da futura lactação, reduzir o desempenho reprodutivo e aumentar a taxa de descarte (Huzzey et al., 2007).

A rbST regula partição de nutrientes, e é amplamente utilizada para aumentar a produção de leite e melhorar a eficiência da síntese de leite no período pós-parto (Bauman, 1999). Contudo, a suplementação de vacas com doses menores (125 mg) do que as apresentadas pela bula (500 mg) de somatotropina recombinante bovina (**rbST**) durante o período de peri-parto tem sido associada com possíveis efeitos benéficos sobre as adaptações fisiológicas e função hepática (Gulay et al., 2003; Gulay et al., 2004).

As modificações no metabolismo da glicose, como a redução na taxa de oxidação em tecidos periféricos e aumento da gliconeogênese hepática, são estimuladas pela utilização da rbST (Bauman, 1992), promovendo conseqüente um aumento nas concentrações de insulina e redução das concentrações de ácidos graxos não esterificados (**AGNE**) no pós-parto (Dann et al., 2006) em função do estímulo ao aumento da ingestão de matéria seca (Duffi et al., 2002). Assim, acredita-se que a utilização da rbST no final da gestação pode ser benéfica e preparar metabolicamente as vacas para o período de transição. Desta forma, amenizando as conseqüências negativas destas alterações e alcançando uma melhor eficiência produtiva, a rbST surge com um potencial amenizador dos efeitos do período de transição (Gulay et al., 2003; Gulay et al., 2004; Schneider et al., 2012).

ArbST atua também na função reprodutiva via fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (**IGF-I**) (Willis et al., 1998), funcionando como um modulador da ação das

gonadotrofinas, estimulando a proliferação das células da teca e granulosa (Armstrong e Webb, 1997), atuando no crescimento de pequenos folículos, além de ser regulador primário da produção de estradiol em bovinos (Butler et al., 2004).

Trabalhos relacionaram a utilização da rbST em vacas no período pré-parto com as concentrações do IGF-I nas secreções lácteas, bem como avaliaram a expressão do *IGF-I* e seus receptores no intestino e fígado dos neonatos. O colostro de vacas que receberam rbST no pré-parto, apresentou níveis de IGF-I 30% superior ao grupo controle. (Balgado et al., 2007), e os níveis elevados de IGF-I provocam um aumento no crescimento e taxa de renovação de células epiteliais, contribuindo para um intestino funcionalmente mais eficiente (Pakkanem e Aalto, 1997; Potten et al., 1997; Balgado et al., 2007).

O rbST é responsável por alterações no metabolismo da glicose, sendo esse efeito particularmente benéfico na fase final da gestação. Qualquer modificação na nutrição materna durante o período pré-parto pode alterar o fluxo de nutrientes para o feto, e assim afetar seu metabolismo hepático. O metabolismo energético é extremamente importante para os neonatos, pois, é comum que os mesmos apresentem um estado de hipoglicemia logo após o nascimento, devido à glicose ser um nutriente vital para diversos órgãos e tecidos, e a glicose presente no colostro não ser suficiente para atender a demanda, portanto há extrema necessidade da ativação do metabolismo gliconeogênico logo após o nascimento (Girard et al., 1992). Portanto, qualquer alteração materna que aumente a eficiência do metabolismo energético dos neonatos pode trazer grandes benefícios ao desenvolvimento destes animais.

Outro aspecto muito importante no metabolismo dos neonatos é a capacidade oxidante, diretamente relacionado com os mecanismos de defesa, que por sua vez pode ser também afetada positivamente por nutrição materna no período pré-parto. Inanami et al., (1999), sugere que a susceptibilidade dos bezerros ao estresse oxidativo, durante o período neonatal pode ser explicada pelo sistema de defesa ainda ser imaturo contra os radicais

superóxido. A oferta de uma dieta com menor concentração energética durante as três últimas semanas de gestação reduziu a capacidade antioxidante de bezerros recém-nascidos (Gao et al., 2012).

Apesar de diversos estudos investigarem as ações da rbST durante o período de transição sobre a performance produtiva de vacas leiteiras (Carriquiry et al., 2009; Schneider et al., 2012; Gohary et al., 2014;) ainda há pouca informação sobre a utilização deste hormônio durante o período seco em relação a seus efeitos no metabolismo da progênie. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito de diferentes momentos aplicação de rbST no período pré-parto em vacas leiteiras sobre eficiência produtiva e reprodutiva da lactação subsequente, bem como avaliar o metabolismo hepático do progênie ao nascimento através da expressão de genes relacionados ao eixo GH-IGF-I, gliconeogênese, sinalização da insulina, captação de glicose e estresse oxidativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e animais utilizados

Foram utilizadas 152 vacas da raça Holandês, alocadas sob mesmas condições ambientais e de manejo, em uma propriedade leiteira no sul do Brasil (32°16' S, 52° 32' W), entre os meses de julho de 2012 à março de 2013.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, conforme os números 2827 e 2562.

Número de lactações, condição corporal, alimentação e tratamentos

Os animais foram divididos ao acaso em três grupos: grupo que recebeu 2 doses rbST (**rbST2**) ($n=60$), grupo que recebeu 3 doses rbST (**rbST3**) ($n=46$) e grupo controle sem aplicação rbST (**GC**) ($n = 46$). Os grupos tratados receberam, em cada aplicação, 500 mg de rbST (Lactotropin[®], Elanco Saúde Animal, São Paulo, São Paulo), em cada aplicação. No rbST2 as aplicações foram realizadas nos dias -28 e -14 em relação a data prevista do parto e no rbST3 foram realizadas 3 aplicações, sendo, nos dias -42, -28 e -14 em relação a data prevista do parto. O escore de condição corporal (**ECC**) foi avaliado através de uma escala, representada de 1 à 5 (1 excessivamente magra e 5 excessivamente gordo), no dia 7 pós parto por um técnico treinado. Os animais eram mantidos sob mesmas condições de alimentação. As mesmas passaram por procedimento de secagem aos 60 dias que antecedem ao parto e foram mantidas ao piquete pré-parto, sob campo nativo, recebendo no cocho dieta ânionica.

Produção de leite e Manejo reprodutivo

Nos 47 dias pós-parto, os animais eram submetidos à exame ginecológico e aqueles aptos eram selecionados para a IATF e posteriormente avaliação de cio natural. Os dados de intervalo entre parto concepção (**IPC**) foram coletados do programa Alpro[®], que gerenciava os dados da propriedade no período do estudo. A produção de leite foi avaliada nos dias 14, 21, 28, 35, 42, 56, 70, 84 dias em lactação (**DEL**), produção leiteira total corrigida a 305 dias de lactação (**PLT**), produção de leite no pico de lactação (**PP**), diade ocorrência do pico e persistência de lactação.

Seleção dos neonatos

Ocorreram 152 partições (74 machos e 78 fêmeas), foram utilizadas vinte bezerras da raça Holandês, as quais foram selecionadas pela homogeneidade de partição dos animais. As

mesmas permaneceram aproximadamente 12 h com as vacas, a fim de ingerirem colostro naturalmente, de acordo com o manejo da fazenda, sendo posteriormente, alojados nas instalações próprias para a categoria. Esses animais foram identificados de acordo com suas mães: neonatos GC (**NGC**) (n=4), neonatos rbST2 (**NrbSR2**)(n=9) e neonatos rbST3 (**NrbST3**) (n=7) e submetidos a biópsia hepática 12 horas após o nascimento.

Biópsia Hepática

O método de biópsia utilizado já foi descrito em detalhe anteriormente (Braga et al., 1985). O ponto de eleição para a introdução da agulha foi o 11º espaço intercostal direito, aproximadamente 20cm abaixo da linha do dorso, no cruzamento de uma linha imaginária entre a tuberosidade externa do íleo e a escápula e outra linha perpendicular ao 11º espaço intercostal. Esse ponto corresponde à posição topográfica do lobo direito do fígado. Após tricotomia e antissepsia do campo com álcool iodado a agulha de biópsia era introduzida no fígado por acesso percutâneo e transtorácico. Os fragmentos de fígado obtidos eram aproximadamente cilíndricos e tinham cerca de: 0,5-1,5 cm de comprimento por 0,1 cm de espessura. Logo após a coleta, os fragmentos do fígado foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados até o processamento.

Extração de RNA, síntese de cDNA e qRT-PCR

O RNA total foi isolado utilizando Trizol (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi purificado utilizando colunas RNeasy e tratado com DNase (QIAGEN®, Germany), seguindo o protocolo do fabricante. A concentração das amostras foram medidas em um espectrofotômetro de UV (Nanodrop Lite, Thermo Fischer Scientific Inc., USA). A razão A260/A280 foi usada como uma indicação da qualidade do RNA. A ausência de degradação do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de

agarose (80 V durante 1,5 h). A transcrição reversa foi realizada com lmg de RNA usando o *i-script* cDNA synthesis Kit (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA) em volume 20 μ L. A reação foi realizada em um termociclador (MyCycle™ Thermo Cycler, Bio Rad) utilizando as seguintes temperaturas: 25 °C por 5 min, 42 °C por 30 min e 85 °C por 5 min. O cDNA foi então diluído para 5 ng/ μ L. Avaliou-se a expressão dos genes Glutathiona Peroxidase (*GPXI*), Mieloperoxidase (*MPO*), Superóxido Dismutase (*SOD2*), Catalase (*CAT*), Glicose 6 fosfatase (*G6PC*), Piruvato Carboxilase (*PC*), Fosfoenolpiruvato Carboxilase (*PCKI*), Facilitador do Transporte de Glicose (*SLC2A2*), Receptor Insulina (*INSR*), Substrato 1 do Receptor da Insulina (*IRS1*), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1 (*IGF-I*), Receptor 1A Hormônio de Crescimento (*GHR-1A*) e Proteína Carreadora do IGF (*IGFBP3*). Foi utilizado o *UXT* (do inglês, ubiquitously expressed transcript isoform 2) como gene de controle interno, com CTs variando de 22 a 23. As informações sobre os primers utilizados são mostradas nas tabelas 1, 2 e 3. qPCR foi realizado usando 4 μ L do cDNA diluído, 5 μ L de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0,4 μ L de cada primer (10 μ M) e 0,2 μ L de água livre de DNase e RNase, realizada em microplacas de 48 poços (Bio-rad, USA), em duplicata, com um controle negativo em cada placa. As reações foram realizadas em um termociclador ECO™ Real-Time PCR System (Illumina®, São Diego, CA USA) utilizando o seguinte protocolo: período de incubação de 2 minutos a 50°C, ativação da polimerase a 95°C durante 10 minutos, seguida de 45 ciclos de PCR de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, seguido por um estágio de *melting* (15s a 95°C, 15s a 55°C e 15s a 95°C). O coeficiente de variação (CV) foi inferior a 10 % para todos os primers utilizados.

A expressão relativa foi calculada a partir da equação $2^{A-B/2C-D}$ (em que A é o valor limiar do ciclo [Ct] para o gene de interesse na primeira amostra do controle; B, o valor de Ct para o gene de interesse na amostra analisada; C, o valor de Ct para o gene UXT na primeira amostra do controle e D, o número Ct para o gene UXT na amostra analisada). A

primeira amostra do controle foi expressa como 1,00 por esta equação, e todas as outras amostras foram calculadas em relação a este valor. Depois disso, os resultados do grupo controle foram ponderadas, e todos os outros resultados foram divididos pelo valor médio da expressão relativa no grupo controle, para se obter a mudança na expressão dos genes de interesse em comparação com o grupo de controle (fold change) (Masternak et al., 2005).

Análise estatística

Os dados obtidos da produção de leite e reprodução foram analisados através de análise de variância (ANOVA) considerando os efeitos fixos de tratamento, período e os efeitos aleatórios de animais. As variáveis que apresentaram diferença ($P < 0,05$) foram submetidas a análises de contrastes ortogonais polinomiais (Steel e Torrie, 1983) ajustados de acordo com o número de aplicações do rbST, utilizando-se o *software* – NCSS (2005).

Todas as análises estatísticas da expressão gênica foram realizadas utilizando o programa SAS 9.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC, EUA), através de análise de variância. Os dados foram transformados à log previamente da análise estatística, para se obter uma distribuição normal dos resíduos, e re-transformados para apresentação. Para todas as análises estatísticas foi considerado significativo o valor de $P < 0,05$. Para tendência $P < 0,10$.

RESULTADOS

Produção de leite e performance reprodutiva

No presente estudo os animais do rbST2 apresentaram maior produção de leite ($P < 0,001$), quando comparado com GC e rbST3 no 35^a dia de lactação, demonstrando assim que vacas tratadas com duas doses rbST durante o pré-parto apresentam um incremento na produção de leite (Tabela 4). No entanto este efeito não parece ser dose dependente, uma vez

que houve um efeito quadrático em relação a dose de rbST. Houve diferença entre os grupos para produção de leite nos 70 dias pós-parto, o rbST3 apresentou maior produção de leite quando comparado ao GC e rbST2 ($P = 0,04$). Nos demais períodos avaliados e na produção de leite total não houve efeito dos tratamentos ($P > 0,05$) (Tabela 4).

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos nas avaliações referentes à Intervalo Parto Concepção e também o número de serviços por concepção. Quando avaliada a condição corporal dos animais aos sete dias após o parto, também não encontrou-se diferença estatística (Tabela 5).

Expressão gênica – tecido hepático dos neonatos

Eixo GH-IGF-I

Dentre os marcadores relacionados ao eixo GH-IGF-I, a expressão de *IGF-I* foi maior nos NrbST2 e NrbST3 quando comparado aos NGC ($P = 0,01$ e $P = 0,02$, respectivamente), entretanto não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre NrbST2 e NrbST3 (Figura 1). A expressão de *GHR1A* apresentou uma tendência ($P = 0,07$) de maior expressão no NrbST3 comparado ao NGC (Figura 1).

Gliconeogênese

A expressão de *PC* foi maior ($P = 0,03$) no NrbST2 quando comparado ao NGC. Houve também uma tendência ($P = 0,09$) de maior expressão no NrbST3 comparado ao NGC. Não foi encontrada diferença ($P > 0,05$) na expressão de *PCK1* e *G6PC* entre os grupos (Figura 2).

Sinalização da insulina e captação de glicose

A expressão de *IRS1* apresentou uma tendência ($P=0,07$) de maior expressão no NrbST3 comparado ao NGC. Não foi encontrada diferença ($P> 0,05$) na expressão de *INSR* e *IGFBP3* entre os grupos (Figura 3). A expressão de *SLC2A2* foi maior ($P = 0,05$) no NrbST2 e no NrbST3 quando comparado ao NGC, entretanto não foi encontrada diferença ($P = 0,95$) entre NrbST2 e NrbST3 (Figura 3).

Estresse oxidativo

Dentre os marcadores relacionados ao estresse oxidativo, a expressão de *CAT* foi maior ($P = 0,01$) nos animais do NrbST2 e NrbST3 comparado NGC, entretanto não foi observada diferença ($P = 0,88$) entre NrbST2 e NrbST3 (Figura 4). Não foi observada diferença ($P> 0,05$) na expressão de *SOD2*, *MPO* e *GPXI* entre os grupos (Figura 4).

DISCUSSÃO

O tratamento pré-parto com somatotropina demonstra ser uma estratégia potencial para melhorar o equilíbrio de energia no pós-parto e conseqüentemente aumentar a eficiência na produção de leite. No presente estudo houve incremento na produção de leite em determinadas semanas da lactação naqueles animais tratados com rbST. Um estudo anterior demonstrou que vacas tratadas com rbST no periparto aumentou a produção de leite (3,1kg/dia) durante os primeiros 280 dias no pós-parto (Carrquiry et al., 2009). Putnam et al., (1999), observou que vacas tratadas com somatotropina (500mg / dia) a partir de 28 dias antes da data prevista do parto produziram 3,3 kg/ d mais leite do que os não tratados durante os primeiros 42 dias em lactação (DEL), como Schneider et al., (2012), que relatou um aumento na produção média diária de leite de 2,8 kg/vaca por dia, com tratamento somatotropina no

pré-parto. Gohary et al., (2014), encontrou uma tendência em vacas tratadas com rbST no pré-parto para produzir mais leite na semana seguinte ao parto, mas não observou o mesmo nos 63 DEL. Esse aumento na produção de leite encontrada no nosso estudo em alguns momentos específicos pode ser explicado por dois possíveis mecanismos. O primeiro pode ser pela ação do rbST na glândula mamária no pré-parto, onde já foi reportado por Stelwagen et al., (1993) que a injeção pré-parto de somatotropina em ovelhas levou a uma maior proliferação de células mamárias e produção de leite, sendo este efeito mediado principalmente pelo IGF-I. Esta maior produção de leite no pós-parto também foi sugerida em função da somatotropina proteger a barreira hemato-leite e restaurar a integridade das junções epiteliais da glândula mamária, reduzindo assim as chances de infecção no período pós-parto precoce (Burvenich et al., 1999). O segundo seria pela dissociação do eixo GH-IGF-1, estimulada pela redução de insulina e glicose circulantes. De qualquer forma, não é possível explicar os possíveis efeitos do rbST na produção de leite nas semanas específicas deste estudo (35 e 70 DEL), uma vez que esta não demonstrou ser consistente com as demais semanas avaliadas. Portanto, outros fatores devem estar associados aos aumentos de produção de leite nestes dias. Os aumentos de produção de leite específicos relacionados aos tratamentos com somatotropina no período pré-parto não afetou ($P > 0,05$) a produção de leite total, corroborando com Eppard et al., (1996), Vallimont et al., (2001) e Acosta et al., (2012).

Há uma redução drástica no nível sanguíneo de insulina em vacas leiteiras, logo após o parto, devido a drenagem de glicose pela glândula mamária para a síntese de lactose (Butler et al., 2003). Esta redução no nível de insulina leva a uma redução na expressão hepática do receptor do GH (*GHR*), especialmente *GHR 1A* (Butler et al., 2003), que compreende 50% do *GHR* hepático (Jiang e Lucy, 2001). Como o IGF-I é produzido em resposta a ativação do *GHR* pelo GH (Jones e Clemmons, 1995), há então uma dissociação do eixo GH/IGF-I, pois com a redução do *GHR* há uma redução na expressão hepática e nível circulante de IGF-I

(Fenwick et al., 2008). Como consequência da redução do nível de IGF-I, o *feedback* negativo realizado pelo IGF-I na secreção de GH é diminuído (Muller et al., 1999) e há um aumento no nível circulante de GH (Butler et al., 2003). Esta elevação do nível de GH é benéfica para a produção de leite, pois, estimula a lipólise e aumenta a disponibilidade de glicose para a síntese de leite pela glândula mamária (Bell et al., 2005).

Neste estudo, encontrou-se similaridade no IPC entre os grupos tratados e controle. Sabe-se que quanto mais precoce o retorno à ciclicidade após o parto, maior as chances de uma concepção precoce. Segundo Kawashima et al., (2007) apenas 50 % de vacas leiteiras saudáveis ovulam o primeiro folículo dominante, nas primeiras 3 semanas após o parto. Outro fator que pode atrasar o retorno a ciclicidade e aumento em dias do IPC é a ocorrência de distúrbios metabólicos no periparto, podendo afetar o desempenho reprodutivo, e a contaminação do útero também pode contribuir para a diminuição das taxas de concepção nas vacas leiteiras.

A concentração de IGF-I circulante, tem papel fundamental na reprodução (Velazquez et al., 2008), pois está relacionado com a idade ao primeiro parto (Yimaz et al., 2006), retorno a atividade ovariana pós-parto (Butler et al., 2006) e sobrevivência embrionária (Velazquez et al., 2005). Além do mais, o IGF-I atua no crescimento e diferenciação de folículos antrais (Rivera e Fortune, 2003). Neste sentido a queda do nível de IGF-I no período pós-parto leva a um atraso no desenvolvimento de folículos antrais e, conseqüentemente, da ovulação. O atraso da primeira ovulação pós-parto, geralmente é associada a um intenso BEN neste período (Butler et al., 2003).

O tratamento com rbST não afetou o ECC, na avaliação do 7º dia após o parto. Segundo Valimont et al., (2001) e Gulay et al., (2003), vacas suplementadas com rbST no período pré-parto não demonstraram efeito do tratamento no ganho de peso dos animais ou escore corporal.

A fim de relacionar com nosso estudo, apresentamos o resultado de Scheneider et al., (2012), que utilizou animais do mesmo rebanho deste estudo, o qual observou menor perda de ECC em vacas leiteiras e concentrações reduzidas de AGNE no pós parto precoce, quando tratadas com rbST no pré-parto. Essa baixa concentração de AGNE, poderia explicar que vacas tratadas com rbST apresentavam balanço negativo de energia menos intenso. E isso pode ser explicado também, pelo que foi relatado por Puntman et al., (1999), que vacas tratadas apresentavam superior ingestão de matéria seca no pré parto. Essas hipóteses corroboram com o nosso achado, mostrando que no presente estudo não houve perda de ECC, pelo fato dos animais não apresentarem um intenso balanço energético, e isto pode ser explicado por um aumento na ingestão de matéria seca e também pelo fato dessa vaca ter sido menos desafiada metabolicamente.

Eixo GH-IGFI

Aplicações de rbST em vacas no período pré-parto (500 mg rbST, aplicados em intervalos de 14 dias, a partir de 35 dias pré-parto, considerando-se a data prevista para a parição) induziu a maior expressão hepática de *IGF-I* nos bezerros (Bagaldo et al., 2007). Similar ao observado no nosso estudo, uma das explicações para esta ocorrência, é a ativação do eixo GH-IGF-I, que nos neonatos tem como função principal atuar sobre seu desenvolvimento corporal. A maturação desse eixo pode ser observada pelo aumento do receptor GHR1A, e consequentemente estímulo da síntese de IGF-I a nível hepático.

A ativação do GHR1A pelo GH no fígado induz a produção de IGF-I (Jones e Clemmons, 1995). Segundo alguns autores, durante o período pré-parto, são reduzidas as expressões hepáticas de *GHR1A* (Radcliff et al., 2003, Rhoads et al., 2004). E com a diminuição de GHR1A, ocorre uma dissociação do eixo GH/IGF-I, ocorrendo, portanto, a redução na expressão também de *IGF-I*.

O sistema IGF em bezerros neonatal é afetado pela alimentação de colostro (Blum e Baumrucker, 2008; Hammon et al., 2012). O colostro contém concentrações elevadas de fatores de crescimento, entre eles IGF-I e II. O aumento da glicose e de insulina em bezerros alimentados com colostro aportam a produção de IGF-I endógeno (Brameld et al., 1999; Butler et al., 2003), tal como indicado pelo aumento da expressão hepática de *IGF-I* em neonatos bovinos (Cordano et al., 2000).

Jacometoet al., (2015) observou que a dieta materna (suplementação com metionina durante as três últimas semanas de gestação) não alterou a expressão hepática de *GHR1A* e *IGF-1* de neonatos bovinos, entretanto foi possível observar um aumento exponencial na expressão destes dois genes durante o primeiro mês de vida, corroborando com a grande importância deste eixo para o desenvolvimento dos animais.

Gliconêogenese

O crescimento e desenvolvimento do feto é um processo fisiológico específico e complexo, sendo diretamente dependente da nutrição materna, que fornece aminoácidos, glicose, entre outros componentes através da circulação sanguínea (Gao et al., 2008, Zhang et al., 2010).

Alguns estudos demonstraram que, a sub ou supernutrição materna durante a gestação pode não só resultar em perturbações para o desenvolvimento fetal (Micke et al., 2010), crescimento e desenvolvimento de órgãos (Gao et al., 2009), mas também levar a modificações pós-natais, observadas no crescimento, metabolismo e composição corporal da progênie (Redmer et al., 2004).

As alterações induzidas pelo rbST no metabolismo energético dos neonatos, demonstrou ser benéfica ao metabolismo hepático, o que pode contribuir para uma melhor

saúde e desenvolvimento, posto pela necessidade de maturação das vias do metabolismo energético.

A atividade da G6PC é baixa no feto durante a gestação, aumenta ao nascimento, tem um pico em poucos dias após o nascimento, e mantêm-se relativamente constante até a idade adulta (Kalhan e Parimi, 2000). Essa ativação ocorre, pois, após o nascimento a nutrição via placentária é desfeita e o feto necessita de glicose para manter seus órgãos ativos, entretanto o tratamento materno com rbST não afetou a expressão hepática do gene G6PC, entretanto aumentou a expressão de PC e PCK1.

Sinalização da insulina e captação de glicose

Os hormônios, tais como, a insulina, desempenham um papel chave durante a gestação, em ditar o particionamento de nutrientes da dieta entre a mãe e o feto. Vacas no final da lactação promovem o redirecionamento glicose a partir de tecidos periféricos para a placenta, um dos principais nutrientes necessários para crescimento fetal (Newbern e Freemark, 2011). Portanto, o tratamento materno com rbST poderia favorecer a sinalização de glicose, o que é muito importante para o metabolismo energético, pois o rbST é uma estratégia com potencial efeito benéfico.

O gene SLC2A2 codifica para o GLUT2. De acordo com Gorovits e Charron (2003), o GLUT-2 é expresso predominantemente nas células hepáticas e β pancreáticas. O GLUT-2 possui uma maior capacidade de transportar a glicose em situações de hiperglicemia (Mcewen e Reagan, 2004). Maior expressão SLC2A2 pode estar ligado com maior eficiência na captação de glicose. Os bezerros alimentados com colostro em comparação com aqueles alimentados com fórmula (sucedâneo) apresentou maior eficiência na captação de glicose (Steinhoff-Wagner et al., 2014).

Estress Oxidativo

O estresse oxidativo, ocorre como consequência do desequilíbrio entre as defesas antioxidantes celulares naturais e do estado pró-oxidante, culminando na produção de espécies reativas de oxigênio destrutivas (ROS), e levando a alterações nas estruturas da membrana celular (Abd Hamid et al., 2011) e a morte celular (Pham - Huy et al., 2008).

Gao et al., (2012) observaram que bezerros nascidos de vacas alimentadas com baixos níveis de energia, apresentavam baixo peso ao nascimento e uma redução na função imunológica e antioxidante, resposta observada nas menores concentrações das citocinas IL-2 e IL-4.

Segundo Gáal et al., (2006) em bezerros recém-nascidos, a concentração de radicais livres no sangue foram 30% maiores do que em suas mães. Evidenciando o estresse oxidativo do pós natal recente,, entretanto a partir dos 3 dias após nascimento há uma diminuição lenta, a qual é devida, provavelmente, à ativação da defesa antioxidante dos recém-nascidos.

Segundo Jacometo et al., (2015), bezerros filhos de vacas que foram alimentadas com minerais orgânicos (ORG) apresentaram menores concentrações de paraoxonase e mieloperoxidase (MPO), e metabólitos reativos ao oxigênio, sugerindo um efeito positivo da suplementação materna com minerais orgânicos. A capacidade antioxidante de bezerros recém-nascidos, também foi alterada de acordo com o nível de energia da dieta materna nos últimos 21 dias de gestação. A redução da energia promoveu uma redução nas concentrações de SOD 2 e GPX1 nos bezerros (Gao et al., 2012). Confirmando o que foi encontrado neste trabalho, onde não obteve-se diferença dos genes SOD 2 e GPX1 dos animais tratados quando comparado com o grupo controle.

Segundo Osorio et al., (2013), embora a concentração sanguínea de MPO não ter sido afetado pelo nível de energia da dieta materna (1,47 vs. 1,24 Mcal NEL/kg), há um aumento na concentração deste marcador entre o nascimento e a primeira semana de vida.

Isso pode ter ocorrido, pelo ativação do sistema de defesa nesse período neonatal. Após o nascimento o neonato ingere o colostro, o qual é uma boa fonte de minerais para terneiros, fornecendo quantidades adequadas de Cálcio, fósforo, Manganês, sódio e zinco, e também rico em três tipos de imunoglobulinas, Ig G (70-80%), IgM (10-15%) e Ig A (10-15%). Cada uma tem uma função: a IgG tem a função principal de identificar e destruir patógenos. A IgM serve como primeira linha de defesa nos casos de septicemia e a IgA protege as mucosas, como a parede do intestino, ligando-se à parede intestinal e evitando a adesão de possíveis patógenos à mucosa. Para que o neonato alcance índices consideráveis de imunidade, o mesmo deve ingerir um colostro de qualidade, em quantidade e no momento correto. Para contribuir com essa explicação, Osorio et al., (2013) encontrou que a fagocitose pelos neutrófilos foi maior em bezerros filhos de vacas que receberam uma dieta com maior densidade energética.

CONCLUSÃO

O rbST quando utilizado no pré-parto (44, 28 e 14 que antecedem o parto), induziu a um aumento na produção de leite em alguns momentos da lactação, de acordo com o número de aplicações do hormônio. Não foi possível observar efeitos das aplicações pré-parto de rbST com o intervalo parto-concepção. Além disso, o tratamento com rbST nas vacas afetou o metabolismo hepático da progênie, induzindo a mudanças positivas no metabolismo destes bezerros, pois as rotas do eixo GH-IGF-I, gliconeogênese, sinalização da insulina, captação de glicose e estress oxidativo são de extrema importância nos neonatos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPQ e FAPERGS pelo apoio financeiro. Á Granja 4 Irmãos S / A, que disponibilizou os animais e instalações agrícolas.

REFERÊNCIAS

- Abd Hamid, N. A., M. A. Hasrul, and R. J. Ruzanna. 2011. Effect of vitamin E on antioxidant enzymes and DNA damage in rats following eight weeks exercise. *Nutr. J.* 10:37–38.
- Acosta, D.A.V., Pfeifer, L.F.M, Schmitt, E., Schneider, A., Silveira, P.A. S, Jacometo, C.B, Brauner, C.C, Rabassa, V.R, Corrêa, M. N, and Del Pino, F.A.B. 2013. Effect of prepartum somatotropin injection in late pregnant Holstein heifers with high body condition score on metabolic parameters, resumption of ovulation and milk production. *Canadian Journal of Animal Science.*93:287-292.
- Armstrong, D. G, and Webb, R. 1997. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod.* 2:139-146.
- Bachman, K.C, D. H, Wilfond, H. H, Head, C. J. Wilcox., and M. Singh.1992. Milk yields and hormone concentrations of Holstein cows in response to Sometribove (Somatotropin) treatment during the dry period. *J. Dairy Sci.* 75:1883-1890.
- Bagaldo, A. R,Pauletti, P,Delgado, E. F,Lanna, D. P. D,Kindlein, L, and Neto, R. M. 2007.Desenvolvimento intestinal de bezerros recém-nascidos aleitados com colostro de vacas tratadas com rbST. *R. Bras. Zootec.* 36:839-846.
- Bauman, D.E. 1992 Bovine Somatotropin: Review of an Emerging Animal Technology. *Journal of Dairy Science.*75: 3432-3451.
- Bauman, D. E. 1999. Bovine somatotropin and lactation: From basic science to commercial application. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17:101–116.
- Bell,A. W, C. L, Ferrell, and H. C. Freetly.2005a.Pregnancy and fetal metabolism. In: Dijkstra,J., Forbes,J. M., and France,J., editors,Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.CAB,Wallingford. 523–550.
- Blum, J. W, and C. R.Baumrucker.2008.Insulin-like growth factors (IGFs), IGF binding proteins, and other endocrine factors in milk: Role in the newborn. In: Bösze,Z., editor,Bioactive components of milk. Springer,New York, NY.397–422.
- Braga, M. M, Castilhos, L.M. L, and Santos, M.N. 1985. Biópsia hepática em bovinos: proposta de nova técnica. *Revista Centro Ciências Rurais.* 15:79-88.
- Brameld, J. M, R. S.Gilmour,and P. J.Buttery.1999.Glucose and amino acids interact with hormones to control expression of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor mRNA in cultured pig hepatocytes.*J. Nutr.*129:1298–1306
- Burvenich, C, M. J. Paape, D. Hoeben, H. Dosogne, A. M. Massart-Leen, and J. Blum. 1999. Modulation of the inflammatory reaction and neutrophil defense of the bovine lactating mammary gland by growth hormone. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17:149-159.
- Butler, S. T, Marr, A. L, Pelton, S. H, Radcliff, R. P, Lucy, M. C, and Butler, W.R. 2003. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J Endocrinol.* 176:205-217.
- Butler, S. T, Peltron, S. H, and Butler, W. R. 2004. Insulin increases 17b-estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction.*127:537-545.

- Butler, S. T, Pelton, S. H, and Butler, W. R. 2006. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *J Anim Sci.* 89:2938-2951.
- Carriquiry, M, Weber, W. J, Dahlen, C. R, Lamb, G. C, Baumgard, L. H, and Crooker, B. A. 2009. Production response of multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed diets enriched with n-3 or n-6 fatty acids. *J. DairySci.* 92:4852–4864.
- Cordano, P., H. M. Hammon, C. Morel, A. Zurbriggen, and J. W. Blum. 2000. Messenger RNA of insulin-like growth factor (IGF) quantification and presence of IGF binding proteins, and receptors for growth hormone, IGF-I and insulin, determined by reverse-transcribed polymerase chain reaction, in the liver of growing and mature male cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 19:191–208.
- Dann, H. M, Litherland, N. B, Underwood, J. P, Bionaz, M, D'Angelo, A, McFadden, J. W, and Drackley, J.K. 2006. Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. *Journal of dairy science.* 89: 3563-3577.
- Duffield, T, Bagg R, DesCoteaux, L, Bouchard, E, Brodeur, M, DuTremblay, D, Keefe, G, LeBlanc, S, and Dick, P. 2002. Prepartum monensin for the reduction of energy associated disease in postpartum dairy cows. *Journal of dairy science.* 85: 397-405.
- Eppard, P. J, J. J, Veenhuizen, W. J. Cole, P. G. Comens-Keller, G. F. Hartnell, R. L. Hintz, L. Munyakazi, P. K. Olsson, R. H. Sorbet, T. C. White, C. A. Baile, R. J. Collier, J. P. Goff, and R. L. Horst. 1996. Effect of bovine somatotropin administered to periparturient dairy cows on the incidence of metabolic disease. *J. Dairy Sci.* 79:2170-2181.
- Fenwick, M.A, R. Fitzpatrick, D.A. Kenny, M.G. Diskin, J. Patton, J. J. Murphy, and D.C. Wathes. Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology.* 34, 31-44. 2008.
- Gaál, T, Ribiczeyné-Szabó, P, Stadler, K, Jakus, J, Reiczigel, J, Kövér, P, Mézes, M., and Sümeghy, L. 2006. Free radicals, lipid peroxidation and the antioxidant system in the blood of cows and newborn calves around calving. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 143: 391–396.
- Gao, F, X. Z. Hou, Y. C. Liu, S. Q. Wu, and C. J. Ao. 2008. Effect of maternal under nutrition during late pregnancy on lambs birth weight. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 21:371–375.
- Gao, F, Y. C. Liu, and X. Z. Hou. 2009. Effect of maternal undernutrition during late pregnancy on growth and development of ovine fetal visceral organs. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 22:1633–1639.
- Gao, F, Liu, Y. C, Zhang, Z. H, Zhang, C. Z, Su, H. W. and Li, S. L. 2012. Effect of prepartum maternal energy density on the growth performance, immunity, and antioxidation capability of neonatal calves. *J Dairy Sci.* 95: 4510-8.
- Girard, P. J, Ferre, J. P, Pegorier, and P. H. 1992. *Duee Physiological Reviews.* 72:507-562.
- Gohary, K, Leblanc, S. J, Lissemore, K. D, Overton, M..V, Von Massow, M, and Duffield T. F. 2014. Effect of prepartum administration of recombinant bovine somatotropin on health and performance of lactating dairy cows. *J. DairySci.* 97 :1–11.

- Gulay, M.S, Hayen, M.J, and Bachman, K.C. 2003. Milk production and feed intake of Holstein cows given short (30- d) or normal (60-d) dry periods. *Journal of Dairy Science*.86:2030-2038.
- Gulay, M. S, Hayen, M. J, Liboni, M., Belloso, T. I, Wilcox, C. J, and Head, H. H. 2004: Low doses of bovine somatotropin during the transition period and early lactation improves milk yield, efficiency of production, and other physiological responses of Holstein cows. *J Dairy Sci*. 87:948-960.
- Hammon, H. M, J. Steinhoff-Wagner, U. Schonhusen, C. C. Metges, and J. W. Blum. 2012. Energy metabolism in the newborn farm animal with emphasis on the calf: Endocrine changes and responses to milk-born and systemic hormones. *Domest. Anim. Endocrinol*. 43:171–185.
- Huzzey, J. M, Vieira, D.M. Weary, D.M. Von, and Keyserlingk, M. A.G. 2007. Parturition behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. *Journal of Dairy Science*.90:3220-3233.
- Inanami, O, Shiga, A, Okada, K., Sato, R., Miyake, Y.I, and Kuwabara, M. 1999. Lipid peroxides and antioxidants in serum of neonatal calves. *J. Vet. Res*. 60:452–457.
- Jacometo, C. B, Osorio, J, S. Socha, M., Corrêa, M. N, Piccioli-Cappelli F, Trevisi, E, and Looor, J.J. 2015. Maternal consumption of organic trace minerals alters calf systemic and neutrophil mRNA and microRNA indicators of inflammation and oxidative stress. *Journal of Dairy Science*. 98: 7717–7729.
- Jiang, H, and M. C, Lucy.2001a. Involvement of hepatocyte nuclear factor-4 in the expression of the growth hormone receptor 1A messenger ribonucleic acid in bovine liver. *Molecular Endocrinology*. 15:1023-1034.
- Jonnes, J.I, D.R. 1995. Clemmons. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews*. 16:3-34.
- Kawashima, C, Fukihara, S, Maeda, M., Kaneko, E, Amaya, Montoya, C, Matsui, M, Shimizu, T, Matsunaga, N, Kida, K., Miyake, Y.-I., Schams, D, and Miyamoto, A. 2007. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction*. 133:155–163.
- Kalhan, D, and Parimi, P. 2000. Gluconeogenesis in the fetus and neonate. *Semin Perinatology*; 24:94-106
- Masternak, M. N, Al-Regajey, K.A, Del Rosario Lim, M. N, Bonkowski, M. S, Panici, J. A, Przybylski, G. K, Bartke, A. 2005. Caloric restriction results in decreased expression of peroxisome proliferator-activated receptor superfamily in muscle of normal and long-lived growth hormone receptor/ binding protein knockout mice. *The Journals of Gerontology*.60:1238–1245.
- McEwen, B. S, and Reagan, L. P.2004. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *European Journal of Pharmacology*. 490:13-24
- Micke, G. C, T. M, Sullivan, R. J, Soares Magalhaes, P. J, Rolls, S. T, Norman, and V. E. A. Perry. 2010. Heifer nutrition during early and mid-pregnancy alters fetal growth trajectory and birth weight. *Anim. Reprod Sci*. 117:1–10.

- Muller, E. E, V. Locatelli, and D. Cocchi. 1999. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiology Reviews*. 79: 511-607.
- Newbern, D, and Freemark, M. 2011. Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 18:409–416.
- Osório, J. S, Trevisi, E, Ballou, M. A, Bertoni, G, Drackley, J. K, and Looor, J. J. 2013. Effect of the level of maternal energy intake prepartum on immunometabolic markers, polymorphonuclear leukocyte function, and neutrophil gene network expression in neonatal Holstein heifer calves. *Journal of Dairy Science*. 96:3573–3587.
- Pakkanen, R, and Aalto, J. 1997. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. *International Dairy Journal*. 7:285-297.
- Pham-Huy, L. I., H.He, and C. Pham-Huy. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 4:89–96. Bertoni, G., A. Ferrari, A. Gubbiotti, and E. Trevisi. 2009. Blood indices calves: Relationship with mother values and changes in the first days of life. *Ital. J. Anim. Sci.* 8:595–597.
- Potten, C, S. Booth, and C. Pritchard. 1997. The intestinal epithelial stem cell. The mucosal governor. *International Journal of Experimental Pathology*. 78:219-243.
- Putnam, D.E, Varga, G.A, and Dann, H.M. 1999. Metabolic and production responses to dietary protein and exogenous somatotropin in late gestation dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 82:982-995.
- Radcliff, R. P, B.L, McCorneek, B.A, Crooker, and M.C. Lucy. 2003. Growth hormone (GH) binding and expression of GH receptor 1A mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. *Journal Dairy Science*. 86:3933-3940.
- Redmer, D.A, J. M, Wallace, and L. P. Reynolds. 2004. Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. *Domest. Anim. Endocrinol.* 27:199–217.
- Rhoads, R.O, J. W, Kim, B. J, Leury, L.H, Baumgard, N. Segoale, S. J, Frank, D.E. Bauman, and Y.R, Boisclair. 2004. Insulin increases the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows. *J. Nutr.* 134:1020-1027.
- Rivera, G. M, and J.E. 2003. Fortune. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology*. 144:2977-2987.
- Schneider, A, Schwegler, E, Montagner, P, Hax, L. T, Schmitt, E, Pfeifer, L. F, Del Pino, F.A, Bianchi, I, Paludo, G. R, and Correa, M. N. 2012. Effect of prepartum somatotropin injection in late-pregnant Holstein heifers on metabolism, milk production and postpartum resumption of ovulation. *Animal*. 6:935–940.
- Steel, R. G. D, and Torrie, J. H. 1983. Principles and procedures of statistics: Biometrical approach. 2nd ed. McGraw-Hill, New York, NY.
- Steinhoff-Wagner, J, Zitnan, R, Schonhusen, U, Pfannkuche, H, Hudakova, M, Metges, C. C, and Hammon, H. M. 2014. Diet effects on glucose absorption in the small intestine of neonatal calves: importance of intestinal mucosal growth, lactase activity, and glucose transporters. *J Dairy Sci*. 97, 6358-69.

- Stelwagen, K, Grieve, D. G, Walton, J. S, Ball, J. L, and McBride B. W. 1993: Effect of Prepartum Bovine Somatotropin in Primigravid Ewes on Mammogenesis, Milk-Production, and Hormone Concentrations. *J Dairy Sci.* 76:992-1001.
- Vallimont, J. E, Varga, G.A, Arieli, A, Cassidy, T. W, and Cummins, K. A. 2001. Effects of prepartum somatotropin and monensin on metabolism and production of periparturient Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:2607–2621.
- Velazquez, M. A, M. Newman, M. F, Christie, P. Cripps, M.A, Crowe, R.F, Smith, H, Dobson. 2005. The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. *Theriogenology.* 64:1977-1994.
- Willis, D. S, Mason, H. D, Watson, H, and Franks, S. 1998. Developmentally regulated responses of human granulosa cells to insulin-like growth factors (IGFs): IGF-I and IGF-II action mediated via the type-I IGF receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:1256-1259.
- Yimaz, A, M. E. Davis, and R.C. M, Simmen. 2006. Analysis of female reproductive traits in Angus beef cattle divergently selected for blood serum insulin-like growth factor I concentration. *Theriogenology.* 65:1180-1190.
- Zhang, R, Q. Y. Diao, N. F. Zhang, Y. Tu, and C. G. Jiang. 2010. Effects of different energy levels on nutrient utilization and serum biochemical parameters of early-weaned calves. *Agric. Sci.* 9:729–735.

Tabela 1: Identificação do gene, número de acesso ao GenBank, posição de hibridização, sequência e tamanho do amplicon dos primers para *Bos taurus* utilizados para analisar a expressão gênica

ID do Gene	# de Acesso	Gene	Posição de hibridização	Primers 5' – 3'	Pb
281209	AC_000179.1	GPX1	F.325	CCCCTGCAACCAGTTTGG	106
			R.430	GAGCATAAAGTTGGGCTCGAA	
511206	AC_000176.1	MPO	F.1311	AGCCATGGTCCAGATCATCAC	105
			R.1415	ACCGAGTCGTTGTAGGAGCAGTA	
281496	NC_024465.1	SOD2	F.620	TGTGGGAGCATGCTTATTACCTT	95
			R.714	TGCAGTTACATTCTCCAGTTGA	
531682	AC_000172.1	CAT	F.644	TTCAGTGATCGAGGGATTCCA	100
			R.743	TGCAATAAACTGCCTCTCCATTT	
538710	AC_000176.1	G6PC	F.538	GGATTCTGGGTCGTGCAACT	10
			R.637	CCGCAATGCCTGACAAGACT	
338471	AC_000186.1	PC	F.3577	GCAAAGTCCACGTGACTAAGG	124
			R.3700	GGCAGCACAGTGTCTGAAG	
282855	AC_000170.1	PCK1	F.601	AAGATTGGCATCGAGCTGACA	120
			R.720	GTGGAGGCACTTGACGAACTC	
282357	AC_000158.1	SLC2A2	F.1358	TTCAGCAACTGGACAGGCAAT	100
			R.1458	AAGACCACACCAGCAAAAAGGA	
408017	AC_000164.1	INSR	F.245	CCCTTCGAGAAAGTGGTGAACA	84
			R.328	AGCCTGAAGCTCGATGCGATAG	
538598	AC_000159.1	IRSI	F.73	TGTTGACTGAACTGCACGTTCT	112
			R.184	CATGTGGCCAGCTAAGTCCTT	
281239	AC_000162.1	IGF-I	F.166	CCAATTCATTTCCAGACTTTGCA	103
			R.268	CACCTGCTTCAAGAAATCACAAAA	
280805	AC_000177.1	GHR-1A	F.	TCCAGCCTCTGTTTCAGGAG	64
			R.	GCTGCCAGAGATCCATACCT	
282261	AC_000161.1	IGFBP3	F.1403	TGTAAGACGAGACAAGCCTCATCA	134
			R.1536	GGCCCCCTGAAGATACAAAATATC	
525680	AC_000187.1	UXT	F.323	TGTGGCCCTTGATATGGTT	101
			R.423	GGTTGTCGCTGAGCTCTGTG	

Tabela 2: Sequenciamento dos produtos da PCR dos primers utilizados neste experimento

Gene	Sequência
<i>G6PC</i>	CTGCATCATTTTCCCATCAAGTTGGTTGCATGAGAGTCTTGTCAGGCATTGCGGAGTTT GCACAACCCAAAACCTCACAA
<i>IGF1</i>	CCGGTACAGGGAATCAGCAGTCTTCCACCCAATTATTTAAGTGCTGCTTTTGTGATTTT TTGAAGCAGGGGTGAAAA
<i>INSR</i>	AGCTGCGGTCTATCTCCGGCCTGCGTCACTTTACTGGCTATCGCATCGAGCTATCAGGC TACG
<i>IRS1</i>	ATCAGGCAGAAAAGCACTGTGACACCAGAACAATGAGTCTGCATAAACTTCATCTTCA ACCTTAAGGACTTAGCTGGCCAACATGGAA
<i>PC</i>	GATCATAGGAGTACAGAATCATCTGGAAGAATCGAGTGACCACGCTGAGACTGGCA GCCTGACCATCCCCGACCCCTGCCTTCAGGACACTGTGCTGCCAGA
<i>PCK1</i>	GCCATGTGTACAGCAGTCGCATCATGACGAGGATGGGCACCAGCGTCCTGGAAGCGCT GGGGACGGCGAGTTCGTCAAGTGCCTCCACAAA
<i>SLC2A2</i>	CGGTCAGAATTGCGGACTTCTGTGGACCTTATGTGTTTTTCCTTTTGCTGGTGTGGTCTT C
<i>SOD2</i>	GCATGTTTGGCCGATTATCTGAGGCCATTTTGGAAATGTGATCAACTGGGAGAATGTAA CTGCAATAC
<i>MPO</i>	AGCCATGGGCTTAACATCACTTACCGGGATTACCTCGATATGGTGCTGGGGCGGGAGG CCCTAGAGGAAGTACCTGCGCGTA
<i>GPX1</i>	ACGAGGAGATCCTGAATTGCCTGAAGTACGTCCGACCAGGCGGGGTTTCGAGCCCA ACTTTATGCTCAA
<i>CAT</i>	CGCAGCAGTAGGATAGGATCGCATACTTTCAGCTGGTTAATGCAAATGGAGAGGCAGT TTATTGCAACCCCTTTA
<i>IGFBP3</i>	ACGCCTGTCTTTATGCCTGCACATCCCGACACACCCACCCGGGGCTACCGGGGCCAGG GTCCCTGGACCAAGGAGATATTTTGTATCTTCAAGGGGCCAAGA
<i>UXT</i>	CTGGTTATCGTGGAGCTCTCAGTTCATTGATCGTAAGAGCAGTCTCCTCACAGAGCTCA GCGACAATCTCAT

Tabela 3: BLASTN dos sequenciamentos com o escore total (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

# de acesso	Gene	Nomenclatura no NCBI	Escore
NM_001076124.2	<i>G6PC</i>	Bos taurus glucose-6-phosphatase, catalytic subunit (G6PC)	59,0
XM_005206497.2	<i>IGF1</i>	PREDICTED: Bos taurus insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) (IGF1)	98,7
XM_005208817.2	<i>INSR</i>	PREDICTED: Bos taurus insulin receptor (INSR)	82,4
XM_003585773.3	<i>IRS1</i>	PREDICTED: Bos taurus insulin receptor substrate 1 (IRS1)	129
NM_177946.4	<i>PC</i>	PREDICTED: Bos taurus pyruvate carboxylase (PC)	123
NM_174737.2	<i>PCK1</i>	Bos taurus phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble) (PCK1)	134
NM_001103222.1	<i>SLC2A2</i>	Bos taurus solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2 (SLC2A2)	95,1
NM_201527.2	<i>SOD2</i>	Bos taurus superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2)	82,4
AC_000176.1	<i>MPO</i>	PREDICTED Bos taurus Myeloperoxidase	78,8
AC_000172.1	<i>CAT</i>	Bos taurus Catalase	91,5
AC_000179.1	<i>GPX1</i>	Bos taurus Glutathione peroxidase 1	123
AC_000177.1	<i>GHR1A</i>	Bos taurus Growth hormone receptor 1 A	
AC_000161.1	<i>IGFBP3</i>	Bos taurus Insulin-like growth factor binding protein 3	159
AC_000187.1	<i>UXT</i>	Bos taurus ubiquitously expressed transcript isoform 2	95,1

Tabela 4: Características da lactação de vacas tratadas com rbST e controle

Variáveis	Valor de P					
	Controle	RbST2	RbST3	Erro	Linear	Quadrática
PLT	3949,6	3862,57	4015,7	178,17	0,87	0,51
PP	40,08	39,77	41,39	1,32	0,56	0,44
Dias Pico	47,93	48,30	49,75	2,98	0,68	0,80
Persistência	-0,10	-0,11	-0,11	8,69	0,41	0,98

^{a,b}Diferenças ($P < 0,05$) entre os tratamentos apresentados nas linhas.

Tabela 5: Variáveis analisadas de reprodução e escore de condição corporal nos diferentes grupos estudados

Variáveis analisadas	P =					
	G C	rbST2	RbST3	EPM	Linear	Quadrática
IPC (Dias)	114	123	130	7,3	0,12	0,91
N ^a Inseminações (Doses)	2,08	2,41	2,39	0,2	0,23	0,58

Tabela 6: Expressão relativa de genes relacionados com o Estresse Oxidativo, a sinalização da insulina e captação de glicose, a gliconeogênese e o Eixo GH-IGF-1, de neonatos filhos de vacas suplementadas com rbST no período pré-parto (NrbST2: duas aplicações de rbST, nos dias 28 e 14 pré-parto; NrbST3: três aplicações de rbST, nos dias 42, 28 e 14 dias pré-parto e NGC: grupo sem aplicações).

Genes	Controle	rbST 2	rbST 3	Erro	P value (Trat)
IGF-I	1.002 ^b	2.7318 ^a	2.3556 ^a	0.6242	0.03
IGFBP13	1	1.4279	1.3083	0.2478	0.37
GHR1A	1 ^b	2.405 ^b	2.5859 ^a	0.6998	0.16
PC	1 ^b	2.2839 ^a	1.7479 ^a	0.5895	0.09
PCK1	1	1,7291	1,8876	0,9673	0.24
G6PC	1	1,2019	1,1787	0,3149	0,86
CAT	1 ^b	3,2774 ^a	3,3860 ^a	0,9487	0,02
MPO	1	1,5491	1,4589	0,8027	0,26
SOD2	1	1,5809	1,5523	0,4274	0,50
GPX1	1	1,2407	1,1494	0,3034	0,40
INSR	1	1,0079	0,9764	0,3755	0,94
IRSI	1.0003 ^b	1,7792	1,9654 ^a	0,4406	0,19
SLC2A2	1 ^b	1,7733 ^a	1,6599 ^a	0,4616	0,10

Figura 1: Produção de leite em oito momentos da lactação, dos três grupos avaliados neste experimento (Grupo controle sem aplicação de rbST, Grupo Dois: 2 aplicações de rbST e Grupo três: 3 aplicações de rbST).

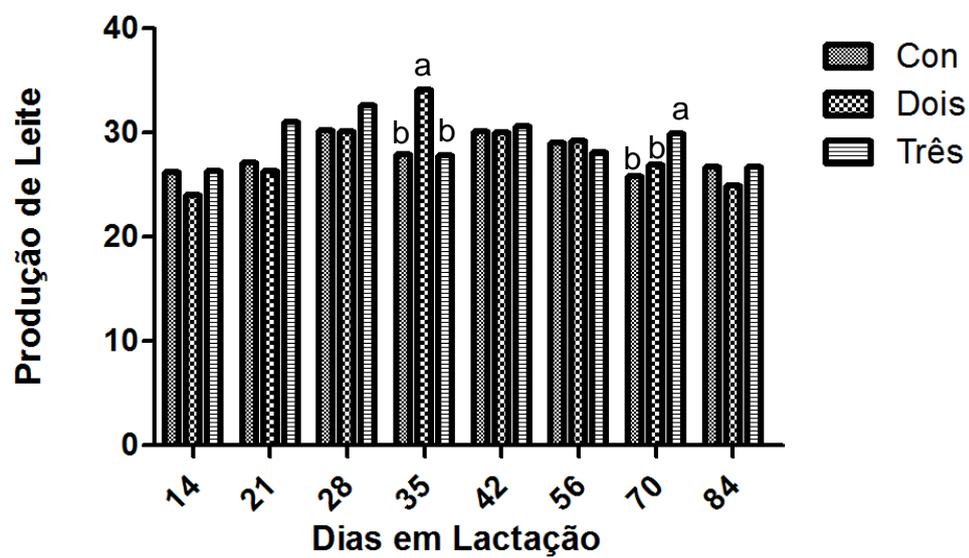
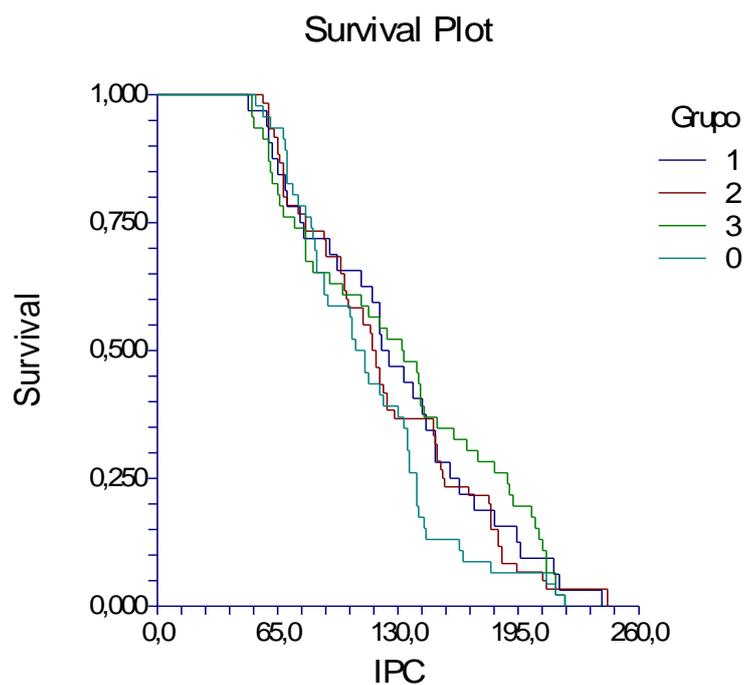


Figura 2: Probabilidade de chance de gestação dos três grupos avaliados neste experimento (Grupo controle (0) sem aplicação de rbST, Grupo Dois (2): 2 aplicações de rbST e Grupo três (3): 3 aplicações de rbST).



5 CONCLUSÃO GERAL

A somatotropina recombinante bovina (rbST) é administrado para aumentar a produção e melhorar a eficiência na síntese de leite, devido a esse potencial hormônio tem sido amplamente utilizado em vacas durante a lactação.

A rbST atua também na função reprodutiva via fator de crescimento semelhante a insulina do tipo I (IGF-I) e funciona como um modulador da ação das gonadotrofinas, estimulando a proliferação das células da teca e granulosa, no crescimento folicular, além de ser regulador primário da produção de estradiol em bovinos.

O tratamento com rbST, no período seco das vacas aumenta a concentração de IGF-I no colostro, faz partição dos nutriente para produção de colostro e redirecionamento para o feto. O aumento de IGF-I circulante pelo tratamento com rbST no período seco, já foi demonstrado que aumentaa transferência de IGF-I para o colostro em 40%, e com esse aumento ocorre o crescimento e desenvolvimento do recém-nascido.

Este estudo foi inédito na área de expressão gênica em neonatos, relacionando a administração de rbST nas vacas leiteiras no período seco atuando na regulação dos genes relacionados ao metabolismo energético, eixo GH-IGF-I, sinalização da insulina e estresse oxidativo da progênie.

Para uma próxima avaliação seria necessária um número maior de animais, no presente estudo utilizou-se apenas progênie fêmea, mas é considerada a ideia de realizar com neonatos machos. Algumas análises complementares seriam validas para corroborar com os resultados já encontrados, como avaliação de metabólitos sanguíneos e também de imunoglobulinas no colostro.

6 REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, D.G. & WEBB, R. (1997). Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod*, 2, p.139-146.
- BAGALDO, A. R., PAULETTI, P., DELGADO, E. F., LANNA, D. P. D., KINDLEIN, L. & NETO, R. M. (2007). Desenvolvimento intestinal de bezerros recém-nascidos aleitados com colostro de vacas tratadas com rbST. *R. Bras. Zootec*, 36, p.839-846.
- BAUMAN, D.E. & CURRIE, W.B. (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Anim Sci*, 63, p.1514-1529.
- BAUMAN, D.E. (1992). Bovine Somatotropin: Review of an Emerging Animal Technology. *J Dairy Sci*, 75, p.3432-3451.
- BAUMAN, D. E. (1999). Bovine somatotropin and lactation: From basic science to commercial application. *Domest. Anim. Endocrinol*, 17, p.101–116.
- BEAM, S.W. & BUTLER, W.R. (1998). Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. *J Anim Sci*, 81, p.121-131.
- BELL, A.W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci*, 73, 2804-2819.
- BROLIO, M.P., AMBRÓSIO, C.E., FRANCIOLLI, A.R., MORINI, A.C., GUERRA, R.R. & MIGLINO, M.A. (2010). A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. *Rev Bras Reprod Anim*, 34, p. 222-232.
- BURTON, J.L, MCBRIDE, B.W., BLOCK, E., GLIMM, D.R. & KENNELLY, J.J. (1994). A review of bovine growth hormone. *Can J Anim Sci*, 74, p. 167–201.
- BUTLER, W.R. (1998). Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 81, p.2533-2539.
- BUTLER, S.T., MARR, A.L., PELTON, S.H., RADCLIFF, R.P., LUCY, M. C. & BUTLER, W.R. (2003). Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J Endocrinol*, 176, p.205-217.
- BUTLER, S. T., PELTRON, S. H. & BUTLER, W. R. (2004). Insulin increases 17 β -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave *J Dairy Reprod*, 127, p. 537-545.
- BUTLER, S. T., PELTON, S. H. & BUTLER, W.R. (2006). Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *J Anim Sci*, 89, p.2938-2951.
- CARR, J. M., OWENS, J. A., GRANT, P. A., WLATON, P. E., OWENS, P. C. & WALLACE, J. C. (1995). Circulating insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs) and tissue mRNA levels of IGFBP-2 and IGFBP-4 in the bovine fetus. *Journal of Endocrinology*, 145, p.545-557.

- CARRIQUIRY, M., WEBER, W. J., DAHLEN, C. R., LAMB, G. C., BAUMGARD, L. H. & CROOKER, B. (2009) A. Production response of multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed diets enriched with n-3 or n-6 fatty acids. *J Dairy Sci*, 92, p.4852-4864.
- DARWASH, A.O., LAMMING, G.E. & WOOLLIAMS, J.A. (1997). The phenotypic association between the interval to post-partum ovulation and traditional measures of fertility in dairy cattle. *Animal Science*, 65, p.9-16.
- DOUGLAS, G.N., REHAGE J., BEAULIEU A.D., BAHAA A.O. & DRACKLEY J.K. (2007). Prepartum nutrition alters fatty acid composition in plasma, adipose tissue, and liver lipids of periparturient dairy cows. *J Anim Sci*, 90, p. 2941-2959.
- DRACKLEY, J.K. (1999). ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier. *J Anim Sci*, 82, p.2259-2273.
- ECHTERNKAMP, S. E., SPICER, L. J., GREGORY, K. E., CANNING, S. F. & HAMMOND, J. M. (1990). Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *BiolReprod*, 43, p.8 –14.
- FENWICK, M.A., FITZPATRICK, R., KENNY, D.A., DISKIN, M.G., PATTON, J. & MURPHY, J.J., WATHES, D.C., (2008). Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol*, 34, p. 31-44.
- GALLO, G. F. & BLOCK, E. (1990). "Effects of recombinant bovine somatotropin on nutritional status of dairy cows during pregnancy and of their calves." *J Anim Sci*, 73, p. 3266-3275.
- GAO, F., Y., HOU, X. Z. & LIU, Y. C. (2007). Effect of maternal under nutrition during late pregnancy on blood biochemical parameters and fetal growth development. *Sci. China C Life Sci*, 37, p.562–567.
- GAO, F., LIU, Y. C. & HOU, X. Z. (2009). Effect of maternal undernutrition during late pregnancy on growth and development of ovine fetal visceral organs. *Asian-australas. J. Anim. Sci*, 22, p.1633–1639.
- GAO, F., LIU, Y. C., ZHANG, Z. H., ZHANG, C. Z., SU, H. W. & LI, S. L. (2012). Effect of prepartum maternal energy density on the growth performance, immunity, and antioxidation capability of neonatal calves. *J Dairy Sci*, 95, p. 4510-8.
- GIRARD, J., FERRÉ, P., PÉGORIER, J. P. & P. H. DUÉE. (1992). Adaptions of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol. Rev.* 72, p. 507–562.
- GONZÁLEZ, F. H. D. (2000) Indicadores sanguíneos do metabolismo mineral em ruminantes. In: González, F.H.G., Barcellos, J.; Patiño, H.O.; Ribeiro, L.A. Perfil Metabólico em Ruminantes – Seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre, Gráfica da UFRGS, p. 31-51.
- GROSVENOR, C.E., PICCIANO, M.F. & BAUMRUCKER, C. R. (1993). Hormones and growth factors in milk. *Endocrine Reviews*, 14, p.710-728.
- GRUMMER, R.R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition cow. *J Anim Sci*, 73, p. 2820–2833.

- GULAY, M. S., HAYEN, M. J., TEIXEIRA, L. C., WILCOX, C. J. & HEAD H. H. (2003) Responses of Holstein cows to a low dose of somatotropin (bST) prepartum and postpartum. *J Dairy Sci*, 86, p. 3195-3205.
- GULAY, M. S., HAYEN, M. J., LIBONI, M., BELLOSO, T. I., WILCOX, C. J. & HEAD, H. H.(2004). Low doses of bovine somatotropin during the transition period and early lactation improves milk yield, efficiency of production, and other physiological responses of Holstein cows. *J Dairy Sci*, 87, p. 948-960.
- GULAY, M.S. & HATIPOGLU, F.S. (2005). Use of bovine somatotropin in management of transition dairy cows. *Journal of Veterinary and animal Sciences*, 29,p. 571-580.
- GULAY, M. S., LIBONI, M., HAYEN, M. J. & HEAD, H. H. (2007) Supplementing Holstein Cows with Low Doses of Bovine Somatotropin Prepartum and Postpartum Reduces Calving-Related Diseases. *J Dairy Sci*, 90, p. 5439–5445.
- HADSELL, D. L., BAUMRUCKER, C. R.& KESINGER, R. S.(1993). Effects of elevated blood insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentration upon IGF-I in bovine mammary secretions during the colostrum phase. *Journal of Endocrinology*,137, p. 223-230.
- HAMMON, H. M., J. STEINHOFF-WAGNER, U., SCHONHUSEN, C. C., METGES. & J. W. BLUM.(2012). Energy metabolism in the newborn farm animal with emphasis on the calf: Endocrine changes and responses to milk-born and systemic hormones. *Domest. Anim. Endocrinol*, 43, p. 171–185.
- HANSEN L.B. (2000).Consequences of selection for milk yield from a geneticistis viewpoint. *J Dairy Sci*,83, p. 1145-1150.
- Harvey, E.A, and Ferrier, D. R. Bioquímica ilustrada.5ª Edição, 528 páginas. Art Med Editora. P. 119.
- IBGE – Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, 2014.
- INANAMI, O., SHIGA, A., OKADA, K., SATO, R., MIYAKE, Y.I. & KUWABARA, M., (1999). Lipid peroxides and antioxidants in serum of neonatal calves. *J. Vet. Res*, 60, p. 452–457.
- JIANG, H. & LUCY, M. C. (2001).Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency. *Gene*, 265, p. 45-53.
- JONES J. I. & CLEMMONS D. R., (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*, 16, p. 3-34.
- KAWASHIMA, C., FUKIHARA, S., MAEDA, M., KANEKO, E., MONTOYA, C. A., MATSUI, M., SHIMIZU, T., MATSUNAGA, N., KIDA, K., MIYAKE, Y. SCHAMS, D. & MIYAMOTO, A.(2007).Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction*, 133,p. 155-163.
- LUCY, M. C. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J. Dairy Sci*, 84, p. 1277-1293.
- MACKEY, D.R., GORDON, A.W., MECROY, M.A., VERNER, M. & MAYNE, C. S.(2007).Association between genetic merit for milk production and animal parameters and the fertility performance of dairy cows. *Animal*, 1, p. 29-43.

- MCBRIDE, B. W., J. L. BURTON, J. H. BURTON, G. K. MCLEOD, & R. EGGERT. (1989). Multilactational treatment effects of rBST on production responses in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci*, 72, p. 430.
- MCMILLEN, I. C., M. B., ADAMS, J. T., ROSS, C. L., COULTER, G., SIMONETTA, J. A., OWENS, J. S., ROBINSON, & L. J. EDWARDS. (2001). Fetal growth restriction: Adaptations and consequences. *Reproduction*, 122, p. 195–204.
- MICKE, G. C., T. M., SULLIVAN, R. J., MAGALHAES, S. P. ROLLS, J., NORMAN, S. T. & V. E. A. PERRY. (2010). Heifer nutrition during early and mid-pregnancy alters fetal growth trajectory and birth weight. *Anim. Reprod. Sci.* 117, p. 1–10.
- MULLER, E.E., LOCATELLI, V., & COCCHI, D.(1999). Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev*, 79, p. 511-607.
- PAKKANEN, R. & AALTO, J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum.(1997). *International Dairy Journal*, 7, p. 285-297.
- PAULETTI, P. Bagaldo, A. R., Kindlein, L., Paz, C.C.P., Lanna, D.P.D. & Neto, R. M. (2005). IGF-I e IgG séricos e nas secreções lácteas em vacas tratadas com rbST no período pré-parto. *R. Bras. Zootec*, 34, p. 976-986.
- PEEL, C. J. & BAUMAN, D. E. Somatotropin & lactation.(1987). *J Anim Sci*, 70, p. 474-480.
- PUTNAM, D. E. VARGA, G.A. & DANN, H.M.(1999). Metabolic and production responses to dietary protein and exogenous somatotropin in late gestation dairy cows. *J Anim Sci*, 82, p.982-995.
- RIVERA, G.M. & FORTUNE, J.E. (2003). Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology*, 144, 2977-2987.
- ROCHE, J.F.D. & MACKEY, M. D. (2000). Diskin. Reproductive management of postpartum cows. *Animal Reproduction Science*, 60-61, p. 703-712.
- RODRIGUES, M., FARO, L. EI., CARDOSO, V. L. & PAZ, C. C. P. (2008). Utilização de somatotropina bovina e seu efeito na avaliação genética de animais da raça Holandesa. In: VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. São Carlos. São Carlos. SBMA, p. 1- 4.
- SCHNEIDER, A., SCHWEGLER, E., MONTAGNER, P., HAX, L. T., SCHMITT, E., PFEIFER, L. F., DEL PINO, F. A., BIANCHI, I., PALUDO, G. R. & CORREA, M. N. (2012). Effect of prepartum somatotropin injection in late-pregnant Holstein heifers on metabolism, milk production and postpartum resumption of ovulation. *Animal*, 6, p. 935–940.
- SENATORE, E. M., BUTLER, W.R. & OLTENACU, P.A. (1996). Relationships between energy balance and post-partum ovarian activity and fertility in first lactation dairy cows. *Animal Science*, 62, p.17-23.
- STAPLES, C.R., THATCHER, W.W. & CLARK, J.H.(1990). Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows. *J Anim Sci*, 73, p.938-947.
- THATCHER, W.W. & WILCOX, C.J. (1973). Postpartum estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow. *J Anim Sci*, 56, p. 608-610.

- VELAZQUEZ, M. A., NEWMAN, M., CRIPPS, M. F. P., CROWE, M. A., SMITH, R. F. & DOBSON, H. (2005). The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. *Theriogenology*, 64, p. 1977-1994.
- VELAZQUEZ, M. A., SPICER, L. J. & WATHES, D. C. (2008). The role of endocrine insulinlike growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domestic Animal Endocrinology*, 35, p. 325-342.
- WATCHES, D. C., REYNOLDS, T. S., ROBINSON, R. S. & STEVENSON, K. R. (1998). Role of the insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *J Anim Sci*, 81, p. 1778-1789.
- WATCHES, D. C., FENWICK, M., CHENG, Z., BOURNE, N., LLEWELLYN, S., MORRIS, D. G., KENNY, D., MURPHY, J. & FITZPATRICK, R. (2007). Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology*, 68, p. 232-241.
- WILLIS, D. S., MASON, H. D., WATSON, H. & FRANKS, S. (1998). Developmentally regulated responses of human granulosa cells to insulin-like growth factors (IGFs): IGF-I and IGF-II action mediated via the type-I IGF receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, p. 1256-1259.
- WITTEWER, F. (2000) Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: González, F. H. D., Barcellos, J. O., Ospina, H. & Ribeiro, L. A. O. (Eds.) Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em 40 nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.