



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**

**EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE ESTIMULAÇÃO ENERGÉTICA  
NA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM CABRAS MOXOTÓ**

**Anderson Pinto Almeida**

**Fortaleza – Ceará**

**Julho, 2006**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

**Anderson Pinto Almeida**

**EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE ESTIMULAÇÃO ENERGÉTICA  
NA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM CABRAS MOXOTÓ**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias – Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Davide Rondina.

**Fortaleza – Ceará**

**Julho, 2006**

A447e

Almeida, Anderson Pinto

Efeito de diferentes protocolos de estimulação energética na resposta superovulatória em cabras moxotó / Anderson Pinto Almeida.

Fortaleza, 2006.

136p.

Orientador: Prof. Dr. Davide Rondina.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)

– Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Pequenos ruminantes. 2. Estimulação energética. 3. Resposta ovariana. 4. Cabras nativas. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 599.735

**Universidade Estadual do Ceará**  
**Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias**

**Título do trabalho:** Efeito de diferentes protocolos de estimulação energética na resposta superovulatória em cabras Moxotó

**Autor:** Anderson Pinto Almeida

Defesa em: 28/07/2006

Conceito obtido: Satisfatório

Nota obtida: 8,7

**Banca Examinadora**

---

**Prof. Dr. Davide Rondina**

**Orientador**

---

Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas

Co-orientador

---

Dra. Alice Andrioli Pinheiro

Co-orientadora

---

Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva

(Suplente)

## **DEDICATÓRIA**

*Pelo amor incondicional...*  
*Pela confiança depositada...*  
*Pela influência positiva...*  
*Pela dedicação...*  
*Pelas esperanças...*  
*Pelo exemplo de vida...*  
*Pela lição de caráter e trabalho...*  
*Pela presença, mesmo na ausência...*  
*Por me ensinarem os bons valores...*  
*Por fazerem de mim o que sou hoje...*  
*... e por me fazerem querer ser igual a eles.*  
*Dedico este trabalho aos meus pais*

*Janary da Silva Lacerda*  
*Nicelina Mendes Pinto Almeida*

*Dedicação especial*  
*Àqueles que depositam em mim grande esperança e amor:*  
*Aos meus avós Benedito e Celina*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me feito trilhar por caminhos que me fizeram estar exatamente aqui neste momento, e por sempre me direcionar para o melhor, dando-me fé para continuar, mesmo diante das situações mais difíceis.

Agradeço aos meus pais, pelo apoio em todos os aspectos e por fazerem de suas vidas uma luta para dar aos filhos condições de buscar seus sonhos.

Agradeço à Priscilla Corrêa da Hora, por ter sido a pessoa mais presente em minha vida, mesmo estando fisicamente separados, sendo assim uma das principais fontes de apoio e incentivo da minha vida.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Davide Rondina, por aceitar me orientar e transformar-se em muito mais do que um orientador, um amigo fiel, com quem sei que sempre poderei contar e que pode contar comigo para qualquer coisa, pelo resto da vida.

Agradeço ao chefe do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução e meu co-orientador, Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas, por me aceitar junto à sua equipe, mesmo sem me conhecer previamente e proporcionando-me condições de aumentar meus conhecimentos e realizar o meu trabalho.

Agradeço à pesquisadora da Embrapa Caprinos e minha co-orientadora, Dra. Alice Andrioli, por ter sido a pessoa que me apresentou ao mundo científico e por ter sido a primeira a me estimular a tomar uma direção que antes nunca havia pensado, mas que hoje é a minha identidade profissional.

Agradeço ao Dr. Edilson Soares Lopes Júnior, pelo incentivo, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e por ter sido uma peça de extrema importância dentro deste trabalho. Agradeço ao Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira, pelos conhecimentos passados e pela disponibilidade sempre que precisei. Ao doutorando Ney Rômulo de Oliveira Paula, pela amizade e pelos ensinamentos, e por me mostrar que nem todo pesquisador tem que ser apenas sério.

Agradeço às minhas amigas de pós-graduação, braços e mãos direitas, Aline Lima de Souza e Iracelma Julião Arruda, pelo companheirismo, amizade e por tudo o que passamos juntos, o que nos tornou os amigos que somos hoje. Aos meus amigos de pós-graduação: Maria Luciana Lira de Andrade, João Batista Cajazeiras, Érika Bezerra de Menezes e Alexsandra Fernandes Pereira, que me mostraram que existem várias maneiras de ser um pós-graduando e por me aceitarem da maneira que eu sou.

Agradeço aos meus eternos co-orientados João Davi Araújo da Silva e Isadora Machado Teixeira Lima, por me darem a honra de acompanhá-los, por me ensinarem que a orientação só é possível quando existe uma amizade verdadeira e por me fazerem uma pessoa melhor com sua presença.

Agradeço aos amigos da iniciação científica, Emanuel Luís Maciel de Medeiros Maia, Camila Pontes Albuquerque, Elizabeth Saraiva Peixoto Pinheiro, Raylene Ramos Moura, Karlliely de Castro Almeida, Deborah de Melo Magalhães, Suely Renata Gaya Avelar e Francisco Carlos de Sousa, por sempre me ajudarem e por me proporcionarem bons momentos dentro desse período que convivemos, os quais sempre estarão em minhas lembranças, fazendo-os inesquecíveis em meu coração.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro durante minha vida acadêmica no mestrado, contribuindo para que eu tivesse condições de concluir essa etapa de minha vida.

Agradeço aos funcionários do PPGCV, pelas orientações e serviços sempre que precisei e por toda a ajuda prestada durante meu mestrado. Agradeço também a todos os funcionários da UECE que sempre que possível me ajudaram no que foi necessário.

Agradeço a todos os professores do PPGV, pelos ensinamentos nessa caminhada e pelos exemplos de professores e pesquisadores.

Agradeço aos funcionários Antônio César Camelo e Selmar Alves da Silva, por sempre ajudarem em tudo o que precisei e pela amizade conquistada.

## **RESUMO**

Para comparar a resposta superovulatória em cabras com balanço energético estimulado, 17 cabras da raça Moxotó adultas foram submetidas a tratamento de sincronização/superovulação com esponjas vaginas com 60 mg de MPA por 11 dias, aplicação de 50 $\mu$ g de cloprosteno 48h antes da remoção da esponja e 120 mg de pFSH nos dias 9, 10 e 11. As cabras foram distribuídas em três grupos: Alimentação ( $n = 5$ ): dieta com 150% da manutenção ( $1,5 \times M$ ); Propilenoglicol ( $n = 5$ ): dieta com  $1,5 \times M$  e administração de 80 mL/cabra/dia de propilenoglicol durante o procedimento hormonal; Insulina ( $n = 7$ ): dieta com  $1,5 \times M$  e 3 injeções de insulina (0,2 UI/KgPV/dia) nos dias 9, 10 e 11. Do momento da colocação da esponja, a cada 3 dias e a partir do início do estro, durante 24h a intervalos de 4h, amostras de sangue foram colhidas para mensurações de insulina e estradiol. A ovulação foi verificada por laparoscopia 8 dias após a remoção da esponja. As taxas de insulina do grupo de cabras tratadas com propilenoglicol foi similar ao grupo Insulina ( $P > 0,05$ ) e ambas foram superiores às cabras suplementadas ( $P < 0,05$ ). Nos grupos Insulina e Alimentação, a concentração do estro foi superior ao grupo tratado com propilenoglicol ( $P < 0,05$ ). Apesar do número de animais que ovularam ter sido similar entre os grupos, as cabras tratadas com insulina mostraram um número maior de folículos e corpos lúteos ( $P < 0,05$ ). Neste grupo, a quantidade de estradiol foi correlacionada ao número de CL ( $r = 0,84$ ,  $P < 0,05$ ). Em conclusão, o tratamento com insulina mostrou-se mais eficiente na resposta ovulatória e mais prático na utilização em campo.

## **SUMÁRIO**

	Pág.
RESUMO	08
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE QUADROS E TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
3. JUSTIFICATIVA	57
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA	59
5. OBJETIVOS	60
6. CAPÍTULO 1	61
7. CAPÍTULO 2	68
8. CONCLUSÃO GERAL	81
9. PERSPECTIVAS	82
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
11. ANEXOS	113

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Períodos críticos durante gestação em ovelhas para a expressão dos efeitos da sub-nutrição materna ( $0,5 \times M \times 1,0 \times M$ ) sobre o desenvolvimento ovariano fetal.	17
Fig. 2. Efeitos do plano nutricional e tipo da dieta durante a maturação do ócito no desenvolvimento de embriões de ruminantes após superovulação e/ou produção <i>in vitro</i> .	20
Fig. 3. Crescimento folicular contínuo. Representação esquemática dos requerimentos por fatores de crescimento, como o TGF $\beta$ e famílias de IGF, e gonadotrofinas em diferentes fases do desenvolvimento do folículo ovariano em bovinos.	28
Fig. 4. Características dos folículos dominantes em novilhas com anestro nutricionalmente induzido durante as ondas precedentes à retomada da ovulação (ondas -6 a -1 e durante 1 <sup>a</sup> (ov1) e 2 <sup>a</sup> (ov2) onda ovulatória na retomada da ovulação.	41
Fig. 5. Relação entre diâmetro do folículo dominante e probabilidade de ovulação em novilhas.	42
Fig. 6. Interação entre fatores metabólicos e função ovariana.	44
Fig. 7. Concentrações plasmáticas médias de IGF-I em novilhas durante restrição alimentar e re-alimentação normalizada relativa ao início do anestro e retomada da ovulação.	53
Fig. 8. Número total de ovulações, folículos totais (2 a 5 mm) e folículos pré-ovulatórios (FPO) observados em cabras da raça Moxotó, recebendo ou não insulina durante um tratamento de superovulação.	66
Fig. 9. Delineamento experimental. Tratamento de sincronização e superovulação: dia 0, colocação da esponja (CE) e início dos tratamentos nutricionais, dia 9, administração de PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> , dias 9-11, tratamento de FSH (pFSH), dia 11, remoção da esponja (RE). Após os 8 dias seguintes, dia 18, laparoscopia (Lap). Alimentação: dieta com 1,5 x requerimentos energéticos de manutenção; Propilenoglicol: dieta com 1,5 x M e administração de 80 mL/dia/cabra durante o tratamento hormonal; Insulina: dieta com 1,5 x M e três injeções de insulina (0,2	72

UI/kgPV/dia) nos dias 9, 10 e 11, em correspondência ao tratamento com FSH.

Fig. 10. Distribuição cumulativa de cabras em estro de acordo com o intervalo (h) entre a remoção da esponja (RE) e o início do estro (IE). 74

Fig. 11. Níveis de Estradiol e Insulina de acordo com o momento do início do estro em cabras ovulando com diferentes protocolos energéticos. Na figura, os valores da insulina são expressos em media  $\pm$  EMP. 75

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Pág.
Quadro 1. Janelas críticas durante as quais a taxa de ovulação de ovelhas é particularmente sensível à nutrição.	23
Quadro 2. Resumo dos efeitos da restrição alimentar crônica e re-alimentação em vários estudos que utilizaram novilhas - nível alimentar, detalhes do folículo e intervalo entre o início do anestro e retomada da ciclicidade.	38
Quadro 3. Resumo dos efeitos da restrição nutricional crônica e re-alimentação em vários estudos que utilizaram novilhas - efeitos sobre as concentrações de gonadotrofinas.	40
Quadro 4. Resumo dos efeitos da restrição nutricional crônica e re-alimentação em vários estudos que utilizaram novilhas - efeitos sobre as concentrações de estradiol e IGF-I.	40
Tabela 1. Número total de folículos de 2 a 5mm observados em cabras da raça Moxotó recebendo ou não insulina durante um tratamento de superovulação.	66
Tabela 2. Resposta estral, ovariana e hormonal em cabras com diferentes protocolos energéticos. Valores expressos em media ± EMP.	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
$3\beta$ -HSD	$3\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase
AGNE	Ácidos graxos não-esterificados
ATP	Adenosina tri-fosfato
bFGF	Fator de crescimento básico do fibroblasto
BMP	Proteínas morfogenéticas do osso
CAPES	Comissão de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior
CCO	Complexo cúmulus-oócito
CE	Colocação da esponja
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EGF	Fator epidermal de crescimento
E.M.P.	Erro médio padrão
FD	Folículo dominante
FGF	Fator de crescimento do fibroblasto
Fig.	Figura
Fpo.	Folículo pré-ovulatório
FSH	Hormônio folículo estimulante
GDF	Fator de diferenciação de crescimento
GH	Hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HCG	Hormônio coriônico gonadotrófico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	Proteína de ligação de IGF
IE	Início do estro
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
LHr	Receptores de LH
M	Manutenção
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
N	Número
ND	Não determinado
NPY	Neuropeptídeo Y

P450arom	Citocromo P450 aromatase
P450c17	Citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilase
P450scc	Citocromo P450 da cadeia de clivagem
PAPP	Proteína plasmática associada à gestação
pFSH	Hormônio folículo estimulante de origem suína
RE	Retirada das esponjas
T3	Triiodotironinna
T4	Tiroxina
TGF	Fator de crescimento e de diferenciação celular

## **1. INTRODUÇÃO**

Apesar de corresponder a menos de 20% do território nacional, a região Nordeste concentra cerca de 93,2% do rebanho caprino, que é de aproximadamente 9,5 milhões de cabeças (IBGE 2002), fazendo da caprinocultura uma atividade de elevada relevância para essa região. A criação de caprinos se constitui em uma atividade de alto valor econômico e social, contribuindo com vários produtos, como carne e leite na alimentação familiar, no entanto, é uma atividade geralmente desenvolvida com baixo nível tecnológico e sistema extensivo de criação, o que faz com que tenha normalmente baixa produtividade.

O interesse pela criação de cabras se deve ao fato que estas são animais perfeitamente adaptáveis às condições adversas, como as observadas em regiões de clima extremamente quente, como o Nordeste do Brasil. Entretanto, um dos principais entraves à exploração destes animais é o conhecimento técnico em relação a manejo e principalmente a nutrição animal com dificuldades em épocas secas, onde existe carência de forragens, debilitando ou tornando inviável a exploração animal.

O potencial reprodutivo é influenciado pelos efeitos nutricionais a curto e a longo prazo, no estro e durante os diferentes estados fisiológicos, quando a fertilidade nos animais e a fecundidade podem ser grandemente condicionadas. Geralmente, a literatura existente sobre a espécie caprina está focalizada apenas sobre alguns aspectos da reprodução. Os dados publicados sobre a relação entre nutrição e reprodução envolvem animais com diferentes estados metabólicos (geralmente não definidos) e, como consequência, apresentam dificuldades quando são analisados em comparações posteriores (Scaramuzzi e Murray, 1994). A relação entre nutrição e ovulação em cabras é evidente e envolve efeitos diretos e indiretos no recrutamento folicular (Mani *et al.*, 1996, Selvaraju *et al.*, 2003).

Objetivando um melhor esclarecimento da importância deste trabalho, será realizada uma revisão de literatura abordando os seguintes tópicos: a nutrição e desempenho reprodutivo em ruminantes (efeitos da nutrição no útero e subsequente fertilidade, efeitos pós-natais, efeitos nutricionais sobre o oócito, efeitos sobre a taxa de ovulação e desenvolvimento embrionário), a nutrição e foliculogênese em ruminantes (efeitos da nutrição sobre o controle do crescimento, maturação e tamanho folicular e mecanismos pelos quais a nutrição afeta a dinâmica das ondas foliculares).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1. NUTRIÇÃO E DESEMPENHO REPRODUTIVO EM RUMINANTES**

É possível afirmar que o controle dos processos reprodutivos (da maturidade à receptividade sexual, prenhez e lactação), com adequada oferta de nutrientes, seja fundamental à sobrevivência das espécies (Cosgrove *et al.*, 1995). A nutrição influencia a fertilidade em ruminantes diretamente através do fornecimento de nutrientes específicos que são necessários para os processos de desenvolvimento do óvulo, dos espermatozoides, ovulação, fertilização, sobrevivência embrionária e o estabelecimento da gestação e indiretamente, através da sua influência nas concentrações circulantes dos hormônios e outros metabólitos sensíveis aos nutrientes que são requeridos para o sucesso destes processos (Robinson *et al.*, 2006).

Relatos da influência nutricional sobre o desempenho reprodutivo em ruminantes domésticos mostram a relação íntima entre a fertilidade e condição corporal e estado nutricional de fêmeas (Robinson, 1996). Também informaram que a prática do “flushing” (incremento nutricional por curtos períodos antes da monta), extensamente utilizada por fazendeiros para aumentar fertilidade, especialmente para animais com uma pobre condição corporal (Robinson, 1996), tem sido associada a um aumento do desenvolvimento de folículos ovarianos e diminuição a porcentagem de folículos de atrésicos nos ovários (Maurasse, 1985).

O potencial reprodutivo é influenciado pelos efeitos nutricionais a curto e a longo prazo, no estro e durante os diferentes estados fisiológicos, quando a fertilidade nos animais e a fecundidade podem ser grandemente condicionadas. Geralmente, a literatura existente sobre a espécie caprina está focalizada apenas sobre alguns aspectos da reprodução. Os dados publicados sobre a relação entre nutrição e reprodução envolvem animais com diferentes estados metabólicos (geralmente não definidos) e, como consequência, apresentam dificuldades quando são analisados em comparações posteriores (Scaramuzzi e Murray, 1994).

#### **1.1 Nutrição no Útero e Subseqüente Fertilidade**

Vários estudos vêm sendo realizados no sentido de se conhecer os efeitos da nutrição no útero no momento da puberdade e na fertilidade em animais. Da Silva *et al.* (2001) observaram um atraso de 5 semanas no início da puberdade em cordeiros com crescimento intra-uterino retardado (2,8 kg ao nascimento), comparado com um controle

(5,2 kg). Embora não houvesse testado seu efeito sobre a fertilidade subsequente, Alejandro *et al.* (2002) acharam que cordeiros oriundos de ovelhas que ganharam 17% de peso corporal durante a segunda metade da gestação tiveram significativamente mais células de Sertoli nos seus testículos ao nascimento que aqueles de ovelhas que apenas mantiveram seu peso corporal durante o período correspondente.

No caso de descendência feminina, Rae *et al.* (2002a) informaram que um baixo nível alimentar ( $0,5 \times$  manutenção) durante os 3 primeiros meses da gestação resultaram em ovelhas, aos 20 meses de idade, possuindo taxa média de ovulação (1,17 contra 1,46) inferior à observada naqueles adequadamente nutridos ( $1,0 \times$  manutenção), mesmo na ausência de uma diferença significativa de peso corporal entre os grupos. Esta redução na taxa de ovulação devido à nutrição uterina inicial aconteceu na ausência de qualquer alteração, tanto durante a vida fetal, como na vida adulta, nas gonadotrofinas hipofisárias (Rae *et al.*, 2002b; Borwick *et al.*, 2003; Da Silva *et al.*, 2003). Isto parece ser resultado de um efeito direto sobre o desenvolvimento fetal do ovário (Fig. 1).

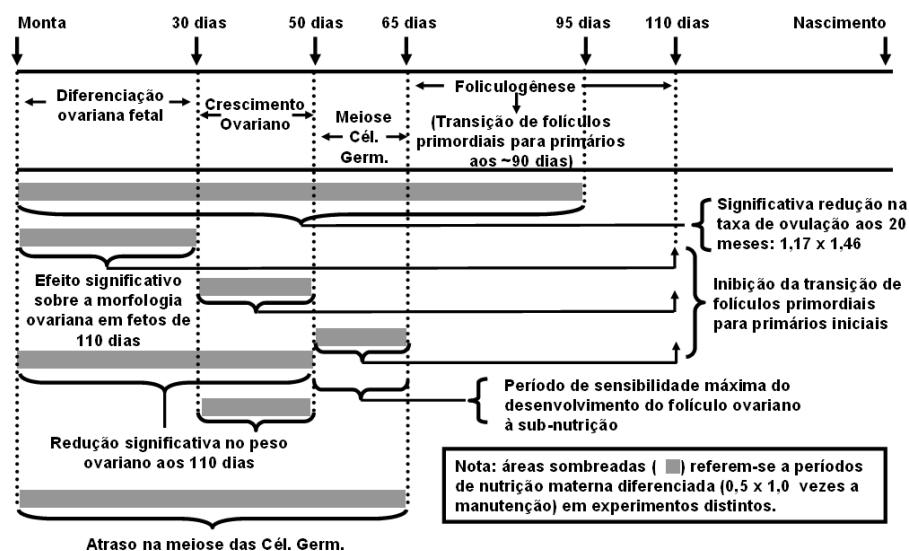


Fig. 1. Períodos críticos durante gestação em ovelhas para a expressão dos efeitos da sub-nutrição materna ( $0,5 \times M \times 1,0 \times M$ ) sobre o desenvolvimento ovariano fetal.

Fonte: Borwick *et al.*, 1997; Rae *et al.*, 2001, 2002a; McEvoy e Robinson, 2002.

## 1.2 Efeitos Nutricionais Pós-Natais

Nutrição durante o início do período pós-natal também pode ter um efeito permanente sobre o número de crias em ovelhas adultas e por inferência em outras espécies de ruminantes de múltiplas ovulações, como as cabras. Por exemplo, sub-nutrição causando um crescimento correspondente a apenas 6 semanas em crias com 8 semanas de idade, oriundas de ovelhas adultas que tiveram sua taxa de ovulação reduzida até os 3 anos

(Williams, 1984) e mais recentemente, um estudo de restrição de crescimento antes da desmama de 12% em crias de ovelhas de colina causou uma redução permanente significativa na sua subsequente prolificidade quando adultas (Rhind *et al.*, 1998). Estas observações, associadas aos efeitos da nutrição uterina têm implicações importantes para otimizar a distribuição de recursos alimentares limitados que caracterizam muitos dos sistemas de criação de ovinos no mundo. Isto é particularmente para criação de ovelhas nascidas em áreas de colina e montanha e então transferidas para fazendas de terrenos baixos onde há uma abundância de forragem de alta qualidade e onde uma taxa reprodutiva alta é essencial para rentabilidade.

Estudos da influência da nutrição pós-natal no momento da puberdade são numerosos. Em geral eles demonstram que a restrição alimentar atrasa a puberdade. Estudos realizados por Chelikani *et al.* (2003) mostraram que novilhas leiteiras Holstein com 100 kg de peso vivo que crescem 1,1; 0,8 e 0,5 kg/dia que alcançam puberdade aos 9, 11 e 16 meses de idade, respectivamente. Porém, para muitas espécies de ruminantes, efeitos sazonais na forma de variações na disponibilidade de nutrientes ou fotoperíodo, nos seus habitat naturais, alteram o momento da puberdade em animais que não a alcançam em uma estação e que tem que esperar outros 12 meses pelas condições fotoperiódicas e/ou nutricionais apropriadas para ativar suas expressões (Adam e Robinson, 1994). Assim, em muitos ambientes naturais há uma enorme diversidade na idade à puberdade, tanto nas espécies, quanto entre raças. Por exemplo, em raças de dias curtos, assim como ovelhas e cabras, a puberdade pode acontecer de acordo com a diminuição da duração dos dias de seu primeiro outono (5-6 meses de idade) fazendo com que cresçam rapidamente. Se a taxa de crescimento inicial é restrita, a puberdade será atrasada até o outono seguinte. De forma interessante, há evidências que o momento de puberdade pode ser menos sensível à nutrição e mais sensível ao fotoperíodo em raças de ovelhas nativas que em raças melhoradas selecionadas para produção (Adam *et al.*, 1998). Em raças nativas, o fotoperíodo pode ser o principal fator desencadeador para a puberdade, uma vez que este pode ser um mecanismo natural para prevenir avanços em puberdade nutricionalmente induzida, o que poderia comprometer a sobrevivência das crias recém-nascidas como resultado de uma provisão inadequada de alimentos e condições climáticas adversas (Adam *et al.*, 1998).

O veado vermelho, por exemplo, em seu ambiente natural, é altamente dependente do decréscimo da duração do dia como indicador do momento da puberdade (Adam, 1991). Devido à sua gestação, de duração 2 meses mais longa que em ovelhas, as parições ocorrem no início do verão, o que impede de atingirem tamanho suficiente para expressar a

puberdade em seu primeiro outono. Assim idades à puberdade são 9-10 meses a mais que para ovelhas e cabras. Devido às restrições impostas pelo ambiente frio em disponibilidade de alimentação, os iaques tibetanos chegam à puberdade durante os meses de verão mais mornos (Zi, 2003). Por isso, naqueles que são bem nutridos, isto pode acontecer com até 13 meses de idade, mas se a nutrição durante a fase crescimento é deficiente, isto pode ocorrer apenas aos 36 meses. Em búfalos, a variação pode ser ainda mais alta (15 meses a 5 anos) com temperaturas altas e a baixa disponibilidade associada à qualidade da forragem que é o principal fator inibitório, como comprovado por uma redução de 39 a 23 meses através do incremento nutricional, que resultou em ganhos de peso diários de 240 a 650g (Nandra *et al.*, 2003). Em búfalos, uma dieta proteica inadequada que conduz freqüentemente a rendimentos sub-ótimos de proteína microbiana ruminal atrasa o início da puberdade (Kaur e Arora, 1995).

### 1.3 Efeitos Nutricionais Sobre o Oócito

Pesquisas de métodos que incrementem a eficiência da múltipla ovulação em ruminantes e programas de transferência de embriões e, mais recentemente, em sistemas *in vitro* de produção de embriões a partir de oócitos obtidos por aspiração de folículos ovarianos têm fornecido novos conhecimentos sobre o impacto da nutrição da doadora de oócito sobre a qualidade do oócito ao utilizar estas tecnologias reprodutivas (Fig. 2).

Excessos dietéticos de proteína degradável no rúmen fornecidos em quantidades discretas nos alimentos levam a concentrações elevadas de amônia no fluido de folicular e está associada com a redução da produção *in vitro* de blastocistos. Um dos efeitos da nutrição sobre o desenvolvimento do oócito é o estresse celular, expresso através da aceleração do metabolismo embrionário, o que pode comprometer a sobrevivência do embrião no período de pré-implantação (Leese, 2002). Esse efeito adverso sobre os oócitos provavelmente envolve a inibição no crescimento e metabolismo das células da granulosa que sustentam o oócito (Rooke *et al.*, 2004). Outros fatores importantes parecem ser a fase e o tamanho específico do folículo, onde, folículos pré-antrais e de tamanho médio são os mais afetados. Sabendo-se que folículos de tamanho médio podem ter sua ovulação induzida através do uso de gonadotrofinas, os efeitos adversos da nutrição parecem ser mais prevalentes em animais estimulados por gonadotrofinas que naqueles que ovulam espontaneamente.

Em vacas leiteiras de alto rendimento, um balanço energético negativo no início da lactação pode comprometer o desenvolvimento do oócito que estabelece a próxima gestação. O oócito se desenvolve em um ambiente bioquímico variável no interior do

folículo, que reflete as mudanças causadas pela nutrição nas concentrações séricas de metabólitos que indicam o *status* energético, proteico e mineral (Leroy *et al.*, 2004a). Vacas que perdem de forma intensa a condição corporal no início da lactação (Snijders *et al.*, 2000) e aquelas com altas concentrações hepáticas de triglicerol, que são indicativos de mobilização excessiva de gordura (Kruip *et al.*, 2001), produzem oócitos de qualidade inferior como observado pela reduzida habilidade para desenvolvimento *in vitro*.

Recentemente, Jorritsma *et al.* (2004) observaram que altas concentrações de ácidos graxos não-esterificados (AGNEs), que ocorrem em casos de subnutrição, reduzem a proliferação *in vitro* de células da granulosa, retardando a maturação do oócio, prejudicando, desta forma, a produção de blastocistos. Assim, um efeito nutricional sobre a qualidade do oócio pode contribuir para a baixa fertilidade de vacas leiteiras de alto rendimento (Royal *et al.*, 2000). Leroy *et al.*, (2004b), sugerem que também pode haver um componente genético específico para esse efeito adverso.

A Fig. 2 fornece uma ilustração dos principais achados destes estudos. Ao contrário de ovelhas e vacas que ovulam espontaneamente para as quais o elevado plano alimentar é benéfico à qualidade do oócio, o oposto ocorre em animais superovulados e seus oóцитos utilizados para produção *in vitro* de embriões. O efeito adverso é acentuado em animais de boa condição corporal (Adamiak *et al.*, 2003) e que quantias elevadas de concentrados são fermentados rapidamente no rúmen (Yaakub *et al.*, 1999).

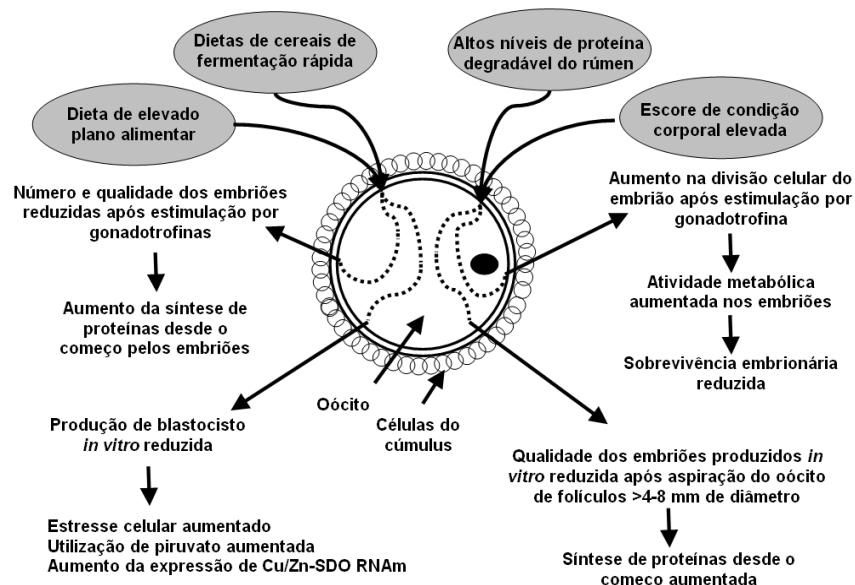


Fig. 2. Efeitos do plano nutricional e tipo da dieta durante a maturação do oócio no desenvolvimento de embriões de ruminantes após superovulação e/ou produção *in vitro*.

Fonte: Boland *et al.*, 2001; Adamiak *et al.*, 2003 e Lozano *et al.*, 2003.

Nos ruminantes, CCOs de folículos antrais e embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento são circundados por fluidos, dos quais eles obtêm seus nutrientes e liberam os produtos da atividade metabólica. Os CCOs são completamente circundados por fluido folicular antral, sendo separados deste pelas células da granulosa, que conectam a granulosa mural ao CCO. Imediatamente após a ovulação, muito do revestimento do címulus que circunda o embrião de ruminante é perdido (Lorton & First, 1979; Thompson & Wales, 1987), de forma que a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial ocorrem em meio a fluidos do oviduto e do útero. Realmente, o embrião ruminante é completamente dependente de uma fonte de nutrição histotrófica por um período prolongado do desenvolvimento, com relação a outras espécies mamíferas, pois não forma nenhuma conexão principal com o lúmen uterino até que ocorra o início da organogênese, que ocorre a partir do Dia 19 em vacas (Betteridge & Flechon, 1988).

Ambas, maturação de CCOs e cultivo de embriões *in vitro*, estão associados a prejuízos no desenvolvimento, principalmente na forma de redução de sobrevivência embrionária após a transferência de embriões (Greve *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1996) e/ou a produção de fenótipos fetais anormais, e atípicamente crias gigantes (Farin & Farin, 1995; Thompson *et al.*, 1995). Tais normalidades do fenótipo fetal demonstram que sistemas *in vitro* criam ambientes nos quais efeitos epigenéticos são manifestados. Além disso, alterações na composição do ambiente *in vitro* podem influenciar a incidência de fenótipos fetais alterados (Thompson *et al.*, 1995; Sinclair *et al.*, 1997). Assim, o ambiente no qual se encontram oócitos e embriões tem efeitos significativos sobre o subsequente desenvolvimento, embora perturbações ambientais possam ser discretas durante os estágios iniciais do desenvolvimento do conceito.

Tais observações também têm sido feitas em consequência a alterações da dieta materna. Dietas pouco energéticas têm sido associadas a baixa capacidade de desenvolvimento oocitário (Kendrick *et al.*, 1999), enquanto dietas altamente protéicas durante os primeiros estágios de desenvolvimento ou transferências assincrônicas de embriões também estão associadas a fetos atípicamente grandes (Maxfield *et al.*, 1998; Kakar *et al.*, 2005). Isso demonstra que o ambiente *in vitro* não é o único a alterar a competência de desenvolvimento e fenótipo fetal.

#### **1.4 Metabolismo da Glicose durante a Maturação *in vitro* do Complexo Címulus-Oócito (CCO)**

Muito pouco é conhecido sobre os requerimentos energéticos do metabolismo do CCO de ruminantes. A maioria dos sistemas de maturação *in vitro* realmente se baseiam

em meios derivados de células somáticas. Estudos têm demonstrado que as células do cúmulus possuem níveis significantes de consumo de glicose nos meios de cultivo. Por volume de tecido base, o consumo de glicose pelas células do cúmulus é 23 vezes maior do que o consumo do oócito. Ao contrário, o oócito consome 3 vezes mais oxigênio que as células do cúmulus (Thompson, 2006). Muito, mas não todo, do consumo de glicose pelas células do CCO de bovino é convertido em lactato, demonstrando uma significante atividade glicolítica aeróbia pelas células do cúmulus (Sutton *et al.*, 2003). Contudo, enquanto a expansão do CCO durante a maturação é acompanhada de um aumento no consumo de glicose, a proporção de glicose direcionada ao lactato parece diminuir com a maturação (Sutton *et al.*, 2003; Sutton-McDowall *et al.*, 2004). Isso é amplamente considerado devido ao aumento na síntese de ácido hialurônico, no qual a glicose (junto com a glutamina) é o principal substrato (Sutton-McDowall *et al.*, 2004). A significância desses requerimentos de glicose durante a maturação *in vitro* pode ser vista com efeito sobre a maturação meiótica em consequência da depleção de glicose. As condições que estimulam a expansão das células do cúmulus causam altíssimos níveis de consumo de glicose, disponibilizada para os CCOs. Uma significante depleção de glicose durante a maturação *in vitro* pode ser causada por uma alta densidade de cultivo *in vitro* de CCOs (Sutton-McDowall *et al.*, 2004). Essas causas podem prejudicar ou retardar a maturação meiótica (Sutton-McDowall *et al.*, 2005). Também é comum que outros fatores atuem sobre o papel da glicose durante a maturação dos CCOs. Hashimoto *et al.* (2000) relataram uma interação envolvendo concentração de glicose e disponibilidade de oxigênio com subsequente capacidade de desenvolvimento durante a maturação *in vitro*. Assim, as concentrações de glicose durante a maturação do oócito funcionam em um nível ideal, enquanto níveis muito altos ou baixos produzem consequências negativas.

### **1.5 Efeitos Nutricionais sobre a Taxa de Ovulação**

A eficiência reprodutiva é principal fator que afeta eficiência produtiva e econômica de produção de carne e leite em bovinos. Status energético, particularmente o balanço energético negativo, tem grande influência sobre o desempenho reprodutivo, afetando a idade da puberdade (Day *et al.*, 1986; Moran *et al.*, 1989; Kinder *et al.*, 1995), intervalo entre partos em bovinos para a produção de carne (Dunn e Kaltenbach, 1980; Richards *et al.*, 1986; Selk *et al.*, 1988; Sinclair *et al.*, 2002) e leite (Beam e Butler, 1997) e taxa de sobrevivência embrionária (Dunne *et al.*, 1999). O folículo ovariano é uma parte integrante do processo reprodutivo, pois tem um papel principal no controle do ciclo estral, determinando o comportamento estral, assegurando a competência do oócito e

subseqüente taxa de sobrevivência embrionária, e determinando tanto o funcionamento do corpo lúteo após a ovulação quanto à síntese de progesterona.

Além dos efeitos nutricionais fetais e pós-natais iniciais sobre a taxa de ovulação em adultos, há momentos durante vida adulta quando taxa de ovulação também é particularmente sensível ao fornecimento de nutrientes (Quadro 1). Em ovelhas, um destes momentos é cerca de 6 meses antes da monta, quando os folículos ovarianos emergem do *pool* de folículos primordiais e têm seu crescimento comprometido. A subnutrição neste momento reduz o número de folículos que emergem e então o número que estará disponível para ovulação. Há evidências recentes que a redução da taxa de ovulação pode ser prevenida através do incremento nutricional (*flushing*) no período de 10 dias antes da monta. De fato, o período crítico para que ocorra um efeito estimulatório do incremento nutricional pode ser até inferior a 10 dias. Assim, em uma recente revisão de literatura científica do efeito do incremento nutricional a curto prazo Viñoles Gil (2003) concluiu que seu efeito benéfico pudesse ser dado em cima de um curto período como 8 a 4 dias antes da ovulação (Dias 10 a 14 do ciclo estral). Este período coincide com o aparecimento da onda folicular ovulatória. A sincronização do estro permite precisão na aplicação de incrementos nutricionais. Porém, a variação do momento da monta que ocorre em rebanhos que ovulam espontaneamente faz com que todas as ovelhas recebam o estímulo nutricional com um período prolongado de incremento nutricional iniciando 10 dias antes da introdução dos carneiros no rebanho.

Quadro 1. Janelas críticas durante as quais a taxa de ovulação de ovelhas é particularmente sensível à nutrição.

Janela nutricionalmente sensível	Órgão / tecido alvo	Mecanismo
Feto		
50-65 dias	Ovário fetal	Alteração na meiose das células germinativas
Neonato		
Pré-desmama	N/D	N/D
Adulto		
6 meses antes da ovulação	Ovário	Alteração no número de folículos saindo do <i>pool</i> primordial
10 dias antes da ovulação	Hipotálamo, hipófise	Mudanças no crescimento folicular ovariana e atresia, qualidade do óocito e taxa de ovulação
4-8 dias antes da ovulação	Ovário	Mudanças no crescimento folicular ovariana e atresia, qualidade do óocito e taxa de ovulação

N/D: não determinado.

Fonte: A partir de dados revisados de Robinson *et al.* (2002a) e Viñoles Gil (2003).

## **1.6 Nutrição e o Desenvolvimento Embriônário**

O ambiente energético que determina a atividade de vias metabólicas para a geração de ATP e substratos anabólicos em embriões de ruminantes têm sido utilizados para a avaliação da competência de desenvolvimento (Thompson, 1996; 2000). A disponibilidade de substratos energéticos, especialmente glicose e oxigênio, tem sido bem caracterizada por alterar a capacidade de desenvolvimento (Lim *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1993). O metabolismo do embrião bovino é caracterizado pela transição do oócito e embrião em estágios iniciais de clivagem, que são completamente dependentes da fosforilação oxidativa, com significante aumento da atividade glicolítica logo após a compactação (Thompson *et al.*, 1996 e 2000). Essa mudança para a glicólise parece ser acompanhada de um diminuição dos requerimentos da fosforilação oxidativa mitocondrial, e o estágio de desenvolvimento embrionário pós-compactação parece beneficiar a diminuição da fosforilação oxidativa durante o cultivo *in vitro* (Thompson *et al.*, 2000; Harvey *et al.*, 2004). O cultivo de embriões em ambientes que não mantêm essas condições de preferência metabólica estágio-específica oferece menos que o necessário para um desenvolvimento ideal (Matsuyama *et al.*, 1993). Embora não haja dados que indiquem evidências diretas, alterações do subsequente desenvolvimento fetal são resultados de condições metabólicas que causam estresse aos embriões e resultam na diminuição do desenvolvimento *in vitro*, como também tem sido relatado em outras espécies, como a murina (Lane & Gardner, 1998).

Pouco tempo de restrição na ingestão da dieta tem sido necessário para aumentar as taxas de gestação subsequentes em bovinos (Dunne *et al.*, 1997). Mantovani *et al.* (1993) mostraram que a produção de embriões transferíveis após superovulação em gado de corte foi significativamente reduzida quando as fêmeas tinham livre acesso ao concentrado, comparado com níveis restritos de concentrado. Yaakub *et al.* (1996) demonstraram que o tipo e o nível de concentrado pode afetar a subsequente produção de embriões transferíveis em bovinos de corte.

Muitas restrições na ingestão da dieta têm mostrado possuir efeitos benéficos na taxa de desenvolvimento embrionário quando fêmeas foram superovuladas e embriões colhidos 7 dias após a monta e cultivados por 24 horas (Nolan *et al.*, 1998). Esta comparação de restrições vs. alimentação à vontade resultam em um aumento do número de blastocistos após cultivo dos embriões por 24 horas. Um aumento no número total de células dos blastocistos também foi verificado. O efeito de dietas extremas no desenvolvimento embrionário é evidente, mas o ponto a qual as mudanças ocorrem é desconhecido.

A formação de blastocisto é a chave para o processo de desenvolvimento no crescimento de um embrião. A blastocele se forma como consequência do transporte de fluidos através do trofectoderma. Este processo é parcialmente facilitado pela Na/K-ATPase; o RNA mensageiro para esta enzima tem sido identificado em embriões bovinos com 7 dias (De Sousa *et al.*, 1997). Ingestão de dietas pode alterar a expressão de genes da transcriptase envolvendo embriões em estádio precoce de desenvolvimento, tais como Na/K-ATPase e Cu/Zn SOD (Wrenzycki *et al.*, 1999).

A situação contrastante, onde o acesso à dieta parece reduzir a qualidade dos embriões, é também consistente. Quando ovelhas são submetidas a altos níveis de glicose e, logo em seguida, superovuladas, a produção de embriões de boa qualidade foi reduzida. A infusão de glicose tem também causado redução nas taxas de gestação (Rubio *et al.*, 1997).

Contudo, o ótimo requerimento nutricional para crescimento folicular e ovulação pode ser diferente daqueles requeridos para um ótimo desenvolvimento embrionário. As razões para tal efeito da glicose no desenvolvimento embrionário não são claras, podendo, porém, ser devido à alta concentração de glicose no plasma, a qual interfere no mecanismo de sinalização das células durante o crescimento pré-ovulatório, desenvolvimento do óvulo ou de embriões em estádio precoce. É sabido que altas concentrações de glicose são deletérias para o desenvolvimento *in vitro* de embriões (Furnus *et al.*, 1996). Há também sugestões que a hipoglicemia em ovelhas é associada com embriopatias (Martin *et al.*, 1998), sendo uma observação consistente com uma relativa incidência alta de más formações fetais ocorridas em mulheres diabéticas. Efeitos similares do excesso de glicose na pré-implantação de embriões é a base para prática em programas de reprodução programada da administração de insulina em mulheres diabéticas para reduzir a glicose sanguínea antes da colheita de embriões.

Um efeito adverso da subnutrição no crescimento do trofoblasto antes da implantação foi observado por Rhind *et al.* (1989) em ovelhas. Receptoras com dietas de metade da manutenção, ao acasalar, obtiveram trofoblastos no dia 11 de 500 µm comparado com 1400 µm para dietas 1,5 vezes a manutenção. Devido à associação íntima entre placenta e tamanho fetal já no dia 60 de gestação na ovelha (Bassett, 1990), parece muito provável que estes efeitos nutricionais iniciais no trofoblasto, que se mantiveram através de subnutrição contínua, poderiam ser traduzidos em uma diminuição do tamanho da placenta e, por conseguinte, numa redução no crescimento fetal no fim da gestação. Por outro lado, se a restrição alimentar é cessada até o dia 40 da gestação, bem antes do tempo quando a placenta alcança seu tamanho máximo (90 dias), os efeitos sobre a placenta e

crescimento de feto parecem ser temporários e não detectáveis ao nascimento (Robinson, 1990).

Embora os mecanismos pelos quais a nutrição controla o crescimento do trofoblasto pré e peri-implantação não tenham sido identificados, é provável que envolvam os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), que têm importante influência endócrina, parácrina e autócrina sobre o metabolismo, divisão celular e diferenciação (Jones e Clemmons, 1995).

A exposição de embriões de ruminantes na fase de divisão inicial, por um período curto de cultivo *in vitro* (1-7 dias), está associada com supercrescimento fetal, além de estar relacionada a uma duração mais longa da gestação e elevada mortalidade neonatal (Walker *et al.*, 1992; Farin *et al.*, 1994). Cultivo de embriões de ovelhas durante 5 dias em meio fluido sintético de oviduto (SOF), contendo um suplemento de soro humano antes da transferência para receptoras, resultou em pesos de nascimento dos cordeiros significativamente superiores que os das crias das matrizes de controle que ovularam espontaneamente ( $42 \pm 0,2$  contra  $3,4 \pm 0,2$  kg,  $P < 0,01$ , Thompson *et al.*, 1994). Em um recente estudo, extremamente controlado, embriões de ovelhas oriundos de processo *in vivo* foram comparados com embriões cultivados em um sistema de co-cultivo em células da granulosa durante 5 dias, demonstrando que houve um menor crescimento fetal, evidente já aos 61 dias de gravidez (74,2 contra 84,5 kg, respectivamente;  $P < 0,01$ ), o qual foi independente da massa da placenta (Sinclair *et al.*, 1997). O aumento do peso observado nos fetos que foram derivados de co-cultivo foi associado com aumento ou hipertrofia de fibra muscular primária precoce e hiperplasia de fibra secundária (Maxfield *et al.*, 1997). Os mecanismos por meio dos quais diferentes sistemas de cultivo *in vitro* influenciam a trajetória de crescimento do embrião ruminante são desconhecidos, mas podem estar amplamente relacionados a fatores nutricionais. O amônio gerado de aminoácidos em cultivo inibe o desenvolvimento e a clivagem em blastocistos de ovelha (Gardner *et al.*, 1994). *In vivo*, a ingestão de uma dieta rica em amônio degradável no rúmen, aumenta as concentrações plasmáticas de uréia, e está associada com aumento da mortalidade embrionária (McEvoy *et al.*, 1997). Porém, em estudos posteriores, a exposição ao amônio demonstrou parecer aumentar a regulação do metabolismo protéico em alguns embriões, e o crescimento fetal foi aumentado entre aqueles que sobreviveram a autotransferência. É concebível que embriões em cultivo sujeitos a um ambiente impróprio, deficiente em nutrientes, estejam susceptíveis a mudanças na expressão de gene, que pode ser letal para o embrião em desenvolvimento ou pode resultar em uma alteração na trajetória de crescimento. Uma evidência indireta para apoiar esta hipótese

vem de estudos que usam F9 de células de carcinoma embrionário, que exibem um padrão de diferenciação análogo ao do embrião em desenvolvimento. Nesta linhagem de células em rápida divisão, a deficiência de aminoácidos alterou a expressão da variedade de genes ligados ao crescimento (Fleming *et al.*, 1998). Porém, é desconhecido se o aumento do crescimento no útero de embriões originados *in vitro* reflete uma trajetória permanente de crescimento, ou se estes embriões poderiam ser influenciados pela manipulação da nutrição das receptoras durante as fases finais da vida pré-natal.

Em animais que expressam taxas naturais de ovulação, a ingestão de uma dieta materna antes da cobertura e a composição corporal no momento da cobertura mostraram influenciar a sobrevivência embrionária (Rhind, 1992). O aumento, por um curto período de tempo, da ingestão alimentar materna antes da cobertura também pode influenciar o desenvolvimento embrionário inicial em animais de superovulados. Altas ingestões alimentares que suprimiram as concentrações de progesterona durante o período de recrutamento de folicular, maturação oocitária e ovulação resultaram em embriões que sofreram um retardamento de crescimento em colheitas realizadas 4 dias depois de inseminação e depois de 72 h de cultivo (McEvoy *et al.*, 1995). Isto permanece estabelecido se estes embriões sobreviverem e tiverem se desenvolvido adequadamente, voltando a um útero de receptoras sincrônica. Embora haja relatos que claramente demonstram que um baixo plano de nutrição durante o início da gravidez seja prejudicial à sobrevivência do embrião (Edey, 1966), o peso de evidência sugere que superalimentação logo após o período de cobertura compromete o estabelecimento de gestação.

## **2. NUTRIÇÃO E FOLICULOGÊNESE EM RUMINANTES**

### **2.1 Controle do crescimento folicular: interações intraovarianas e influência da nutrição**

Em ruminantes monovulatórios, como o bovino, dentre outras espécies, o crescimento de folículo primordial, uma vez iniciado, ou continua até o folículo se tornar atrésico ou continua até a ovulação. Ainda não são totalmente conhecidos os mecanismos que controlam o início e o número de folículos primordiais que começam a crescer (Webb *et al.*, 2004). Estudos confirmaram que leva meses para um folículo primordial alcançar o estágio de organização de pré-ovulatório (Fig. 3). Embora o crescimento de folicular seja controlado principalmente através das gonadotrofinas e por fatores de crescimento produzidos localmente, vários fatores ambientais, como a nutrição, podem influenciar

desenvolvimento folicular e qualidade do oóbito, e consequentemente a fertilidade (Garnsworthy e Webb, 1999; Webb *et al.*, 1999a,b, 2003).

O consumo alimentar atua em vários níveis dentro do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano, atuando sobre a atividade ovariana. O estado nutricional também tem sido correlacionado com a sobrevivência embrionária, e é o fator predominante no controle da eficiência de tecnologias voltadas para a reprodução. Além disso, em vacas leiteiras, aumentos na produção de leite e demanda metabólica têm sido associados com longos períodos de anestro pós-parto e ciclos estrais anormais (Royal *et al.*, 2000; Lucy, 2003). Contudo, os mecanismos fisiológicos detalhados, através dos quais a nutrição exerce muitos desses efeitos, permanecem ainda sem uma caracterização completa.

Fatores de crescimento parecem ser importantes tanto na iniciação quanto no crescimento inicial do folículo, considerando que gonadotrofinas são essenciais para as fases finais de crescimento folicular. Nesta consideração, o folículo dominante troca sua exigência de FSH para LH. Também há crescentes evidências que gonadotrofinas podem influenciar desenvolvimento folicular antes de formação de antro e os fatores de crescimento podem influenciar o desenvolvimento do folículo ao longo do crescimento folicular contínuo.

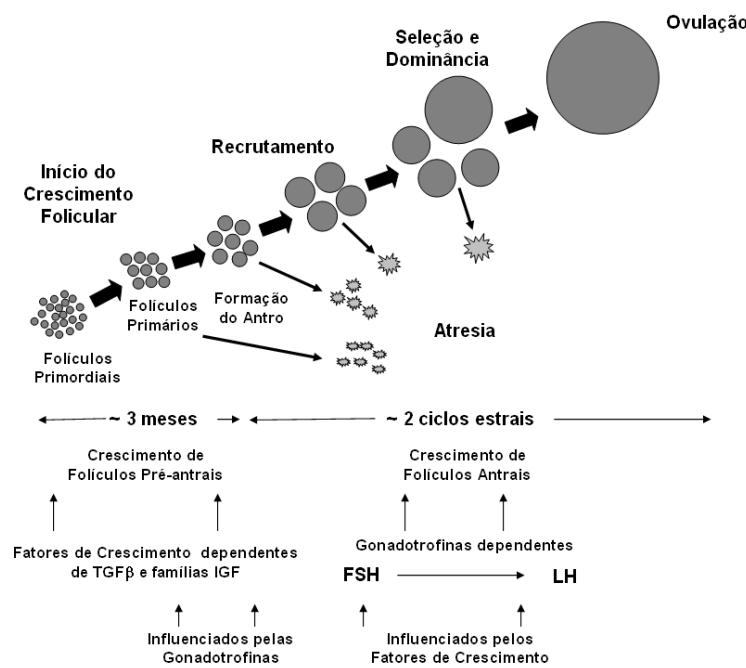


Fig. 3. Crescimento folicular contínuo. Representação esquemática dos requerimentos por fatores de crescimento, como o TGF $\beta$  e famílias de IGF, e gonadotrofinas em diferentes fases do desenvolvimento do folículo ovariano em bovinos.

Fonte: Webb *et al.*, 2004.

## **2.2 Crescimento Folicular e Maturação**

### **2.2.1 Crescimento do Folículo Pré-antral**

Os mecanismos que regulam a ativação e subsequente crescimento dos folículos primordiais permanecem ainda pouco esclarecidos. Contudo, o crescimento desses folículos depende, provavelmente, da presença de interações entre as células da granulosa e o oócito (C-KIT/KIT ligante) além da secreção de uma série de fatores locais (fatores de diferenciação e crescimento [GDF]-9, proteínas morfogenéticas do osso [BMP], ativinas, inibinas, fator de crescimento básico do fibroblasto [bFGF], e fator epidermal de crescimento [EGF] McNatty *et al.*, 1999; Knight e Glister, *et al.*, 2002; Smitz e Cortvindt, 2002; Webb *et al.*, 2003). Por exemplo, ovinos com uma mutação no gene BMP15 são inférteis, possuindo folículos que não se desenvolvem além do estágio primário (Galloway *et al.*, 2000). Ambos GDF-9 e BMP15 têm sido observados localizados no oócito, e imunização contra esses peptídeos retarda o desenvolvimento de folículos ovinos, que permanecem em estágio pré-antral ou primário (Juengel *et al.*, 2002).

RNA mensageiro para enzimas esteroidogênicas, citocromo P450 da cadeia de clivagem (P450scc), citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilase (P450c17), e 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD) são primeiramente expressas logo após a formação da teca interna. Citocromo P450 aromatase (P450arom) está localizada somente nas células da granulosa (Bao e Garverick, 1998) e folículos pré-antrais parecem capazes de produzir estradiol nos primeiros estágios de desenvolvimento (Thomas *et al.*, 2001).

As gonadotrofinas provavelmente não estão envolvidas na iniciação do crescimento folicular (Wandji *et al.*, 1992; McNatty *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2000; Fortune *et al.*, 2000), embora RNAm de receptores de FSH possam ser detectados nos folículos com apenas uma ou duas camadas de células da granulosa (Bao e Garverick, 1998). Estudos *in vivo* (Campbell *et al.*, 2000) e *in vitro* (Hulshof *et al.*, 1995; Gutierrez *et al.*, 2000) têm demonstrado que o FSH pode acelerar a taxa de desenvolvimento de folículos pré-antrais. O papel do LH nesses estágios iniciais de desenvolvimento não tem sido descrito, embora a expressão de RNAm de receptores de LH (LHR) seja detectada a partir de quando a teca interna se forma ao redor das células da granulosa (Bao e Garverick, 1998).

Fatores produzidos localmente também possuem papéis importantes nesses estágios iniciais de desenvolvimento. Em um estudo recente, Armstrong *et al.* (2002a) demonstraram que células da granulosa de folículos pré-antrais bovinos expressam RNAm da proteína de ligação de IGF (IGFBP)-2 e receptor de IGF do Tipo 1. Também foi demonstrada a expressão de RNAm de IGFBP-3 na teca externa de folículos antrais e no

tecido do estroma ao redor dos folículos pré-antrais. A expressão de IGF-I nas células da granulosa, pelo contrário, permanece ainda controversa, com estudos (Spicer e Echternkamp 1995; Yuan *et al.*, 1998; Perks *et al.*, 1999; Webb *et al.*, 1999a; Schams *et al.*, 2002) demonstrando a presença ou ausência de IGF-I nas células da granulosa de ambos folículos antrais e pré-antrais. O fator II de crescimento ligado à insulina tem sido detectado na camada das células da teca de folículos antrais bovinos (Yuan *et al.*, 1998; Webb *et al.*, 2003). Isso sugere que o IGF regula primariamente o crescimento de folículos pré-antrais via mecanismos endócrinos, com IGFBP-2 e -3 regulando a biodisponibilidade de IGF-I e IGF-II extra ovariano derivados de folículos antrais adjacentes.

Fator-I de crescimento ligado à insulina, bem como o EGF, tem sido apontado como estimulador do crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais (Gutierrez *et al.*, 2000; Saha *et al.*, 2000). Ao contrário, concentrações elevadas de IGF-I podem ter efeitos negativos sobre o crescimento oocitário (McCaffery *et al.*, 2000). Assim, o papel de IGFBP produzido localmente mantém, provavelmente, as concentrações de IGF em níveis ótimos para o crescimento do oócito e do folículo pré-antral, mas não durante o crescimento dos folículos primordiais. Outros fatores provavelmente estão envolvidos no início, e subsequente desenvolvimento de folículos primordiais (McNatty *et al.*, 1999; Juengel *et al.*, 2002).

### **2.2.2 Crescimento do Folículo Antral**

Os estágios finais de desenvolvimento dos folículos antrais nos bovinos são caracterizados por duas ou três ondas de crescimento folicular durante cada ciclo estral. Ondas foliculares parecem ser constitutivas e têm sido observadas no início da puberdade e durante outros períodos de anestro (Adams, 1999; Ireland *et al.*, 2000). Cada onda de crescimento em bovino é caracterizada por um recrutamento de um grupo de folículos, que continua a crescer até aproximadamente 6-8 mm de diâmetro. Em espécies monovulatórias, como a bovina, um único folículo é selecionado para continuar crescendo e se tornar dominante.

Folículos antrais em crescimento, a partir de 2 mm de diâmetro, estão sob o controle de gonadotrofinas (Campbell *et al.*, 1995) como demonstrado pelo tratamento de bovinos hipogonadotróficos com fluido folicular bovino e estradiol (Campbell *et al.*, 2003). Cada onda de crescimento folicular é precedida por um aumento transitório da secreção de FSH (Adams, 1999). Recentemente foi sugerido que as concentrações periféricas de inibina-A e de FSH influenciam o número de ondas foliculares (Parker *et al.*, 2003) e que as concentrações de FSH controlam o intervalo de emergência da onda

folicular subsequente (Ginther *et al.*, 2002a). Foi demonstrado que mudanças no padrão de expressão de RNAm de receptores para gonadotrofinas (FSHr e LHR) e enzimas esteroidogênicas chave do citocromo P450, incluindo P450scc, P450arom e 3 $\beta$ -HSD, ocorrem a partir dos últimos estágios de desenvolvimento de folículos de aproximadamente 2 mm de diâmetro (Bao e Garverick, 1998; Webb *et al.*, 1999a).

Especificamente, folículos de aproximadamente 5 mm de diâmetro (recrutamento) e os subsequentes são caracterizados pela indução da expressão de RNAm de receptores de gonadotrofinas e enzimas esteroidogênicas a partir do aumento do tamanho folicular. Em dois estudos recentes, infusões de FSH em bovinos, nos quais a secreção de gonadotrofinas hipofisárias foi significativamente reduzida por um agonista de GnRH (GnRHa) ou imunização contra GnRH, estimularam o crescimento folicular até 8,5 mm de diâmetro (Crowe *et al.*, 2001; Garverick *et al.*, 2002). Esse crescimento folicular foi acompanhado por um aumento na expressão de RNAm para P450scc e P450arom nas células da granulosa e P450c17 nas células da teca, quando comparados ao recrutamento de folículos de tamanho similar em vacas com ciclos estrais normais.

Além disso, infusões de FSH por 48 h (Garverick *et al.*, 2002) também induzem um aumento na expressão de P450scc e P450arom nas células da granulosa de pequenos folículos (1 a 4 mm) quando comparados aos folículos de animais do grupo controle. Fato similar acontece também em ovinos, que possuem a maioria dos genes FecB, e que após infusões de FSH, apresentam um aumento na taxa de ovulação e diferenciação folicular precoce (Souza *et al.*, 2003; McNatty *et al.*, 2003; Mulsant *et al.*, 2003). O gene FecB é uma mutação do gene do receptor de BMP-1B e aumentos na expressão de RNAm para a P450arom e a subunidade da inibina- $\beta$ A nas células da granulosa (Webb *et al.*, 1999a) demonstram claramente a importância de mecanismos de controle local.

Fatores de crescimento produzidos localmente são conhecidos por atuarem de forma importante sobre o desenvolvimento do folículo. E recentemente foi demonstrado que a BMP pode alterar a esteroidogênese e proliferação das células da granulosa bovina *in vitro*. Outros membros da superfamília TGF $\beta$  também têm sido apontados como atuantes nos mecanismos adicionais de controle local da BMP e seus receptores (BMP-15, BMP receptor [BMPR]-2, BMPR-1A e BMPR-1B), inibinas e ativinas. Os papéis precisos desses fatores são ainda desconhecidos, mas, similar ao sistema de IGF, são comumente envolvidos na diferenciação folicular por melhorar a ação das gonadotrofinas (Campbell e Baird, 2001; Knight e Glister *et al.*, 2002; Montgomery *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002).

No período de formação do antro verifica-se o início da expressão de RNAm de IGF-II, detectado primeiramente nas células da teca. Receptores do Tipo 1 de IGF e uma

gama de IGFBPs (IGFBP-2, -3, e -4) também tem sido detectados durante esse estágio de desenvolvimento (Armstrong *et al.*, 1998, 2000). Contudo, a hibridização *in situ* tem falhado na detecção da presença de RNAm de IGF-I nas células da granulosa em todos os estágios de desenvolvimento folicular (Armstrong *et al.*, 1998, 2000; Perks *et al.*, 1995, 1999).

Ao contrário, Leeuwenberg *et al.* (1995), em ovelhas, e Yuan *et al.* (1998), em bovinos, demonstraram a presença de RNAm codificante para IGF-I nas células da granulosa de ambos folículos, subordinado e dominante. Trabalhos anteriores usando cultivos de células da granulosa bovina (Spicer *et al.*, 1993; Spicer e Echternkamp, 1995; Spicer e Chamberlain, 2000) detectaram ambos RNAm de IGF-I e IGF-II. Contudo, existe uma concordância geral de que o IGF-II, produzido pelas células da teca, é o principal tipo de IGF intrafolicular que regula o crescimento de folículos antrais bovinos (Yuan *et al.*, 1998; Armstrong *et al.*, 1998, 2000; Webb *et al.*, 1999a) através da atuação de receptores do Tipo 1 de IGF (Adashi *et al.*, 1990; Lucy, 2000).

### **2.2.3 Seleção Folicular e Dominância**

Os mecanismos precisos de seleção e dominância ainda necessitam serem completamente elucidados. Acredita-se que uma diminuição na secreção de FSH após a emergência da onda folicular pode ser a chave do mecanismo de seleção folicular.

Todos os folículos recrutados parecem contribuir com o declínio inicial de FSH periférico (Gibbons *et al.*, 1997), e o folículo maior tem ação principal sobre o decréscimo nas concentrações de FSH circulante a níveis abaixo do requerido para manter o crescimento contínuo do grupo de pequenos folículos (Campbell *et al.*, 1995; Webb *et al.*, 1999a; Ginther *et al.*, 2001). Os principais fatores produzidos por folículos em crescimento e o selecionado que atuam na supressão da secreção de FSH são estradiol e inibina (Webb *et al.*, 1999a,b; Bleach *et al.*, 2001). Essa supressão resulta rapidamente em danos que alteram o tamanho do futuro folículo dominante e do maior folículo subordinado, o que pode ser detectado dentro de um período de 8h, quando o futuro folículo dominante estará com aproximadamente 8,0 a 8,5 mm de diâmetro (Kulick *et al.*, 1999). Isso tem mostrado que infusão de FSH pode anular o processo de seleção folicular (Mihm *et al.*, 1997). Essas alterações no diâmetro entre os dois maiores folículos têm sido associadas ao aumento transitório nas concentrações periféricas de LH (Kulick *et al.*, 1999) e redução intrafolicular de estradiol, induzida por tratamento com soro anti-estradiol (Beg *et al.*, 2003).

Próximo ao momento da seleção do folículo dominante (aproximadamente 8 a 9 mm de diâmetro), a expressão de RNAm de LHR e 3 $\beta$ -HSD pode ser detectada nas células da granulosa (Bao e Garverick, 1998; Webb *et al.*, 1999a), mantendo o conceito de que o folículo dominante pode utilizar o LH para manter a continuação do crescimento até mesmo quando as concentrações circulantes de FSH estão declinando. Certamente, a sobrevida do folículo dominante pode ser prolongada com a manutenção de uma quantidade ótima de LH pulsátil (Fortune, 1994). Estudos com infusão têm demonstrado que o FSH sozinho, ou em combinação com LH, em concentrações fisiológicas estimulam folículos de 4 mm a se desenvolverem até o estágio pré-ovulatório, e esses folículos pré-ovulatórios foram capazes de ovular em resposta ao HCG (Webb *et al.*, 2003). Além disso, LH pulsátil adequado fornece os requerimentos para manter a competência ovulatória de grandes folículos (9 mm de diâmetro) quando as concentrações de FSH estão diminuindo.

A duração da exposição ao FSH é crítica para uma seleção folicular e dominância normais, tal como exposições ao FSH por mais de 48h, quando os folículos recrutados alcançaram o diâmetro de 6 a 7 mm, sempre induzindo a resposta superovulatória, enquanto exposições por aproximadamente 48h resultaram na seleção de um ou dois folículos dominantes (Webb *et al.*, 2003). Esses dados são compatíveis com aqueles gerados usando um modelo similar em ovinos (Campbell *et al.*, 2000) e estão de acordo com os conhecimentos do papel do declínio do FSH, e subseqüentemente aparecimento do LH no período de seleção do folículo dominante (Campbell *et al.*, 2003).

Esses efeitos das gonadotrofinas são quase certamente mediados em conjunto com fatores de crescimento produzidos localmente. Utilizando sistemas de cultivo onde o fenótipo celular de células da granulosa é mantido (Campbell *et al.*, 1995; Gutierrez *et al.*, 1997a; Nicholas *et al.*, 2000), tem sido demonstrado que o FSH pode induzir a produção de estradiol por células da granulosa em bovinos, e também, que esta indução está relacionada com um aumento na expressão de RNAm da P450arom (Silva e Price, 2001). Utilizando sistemas de cultivo similares, uma ampla gama de fatores locais, incluindo membros da superfamília TGF $\beta$ , FGF, EGF/TGF $\alpha$  e citocinas, parece estar envolvida na regulação do crescimento folicular (Armstrong e Webb, 1997; Webb *et al.*, 1999a,b). Por exemplo, tem sido demonstrado que o IGF-I, bem como a insulina, interagem com o FSH para estimular a produção de estradiol pelas células da granulosa (Gutierrez *et al.*, 1997b; Spicer *et al.*, 2002).

Em vacas, a expressão do gene IGF-II é restrita às células da teca de folículos antrais (Armstrong *et al.*, 2000), reforçando que o IGF-II é o principal IGF intra-ovariano.

Proteínas de ligação dos fatores de crescimento semelhantes à insulina também possuem um papel regulatório sobre o desenvolvimento folicular. Em folículos antrais de até 9 mm, em bovinos, a expressão de RNAm IGFBP-2 e -4 é restrita a células da granulosa e da teca, respectivamente (Armstrong *et al.*, 1998). Realmente, a conversão de folículo subordinado a um futuro folículo dominante tem sido associada ao aumento transitório da ativina A, do estradiol, e diminuição de IGFBP-2 no fluido folicular (Ginther *et al.*, 2002a; Kojima *et al.*, 2003).

Estes resultados também estão de acordo com os achados de Echternkamp *et al.* (1994) e Austin *et al.* (2001), que observaram que as concentrações de IGFBP-2, e possivelmente IGFBP-4 e -5, são mais altas no fluido de folículos pequenos e médios, e no fluido folicular de folículos atrésicos grandes, mas foi significativamente reduzido ou indetectável no fluido de folicular de grandes folículos dominantes (Nicholas *et al.*, 2002), possivelmente devido ao FSH que age para inibir a expressão de IGFBP-2 indiretamente (K. J. Woad, B. K. Campbell, H. A. Garverick, C. G. Gutierrez, J. -G. Gongo, G. Baxter, C. O. Hogg, R. Webb, e D. G. Armstrong). Além disso, uma redução nas concentrações de IGFBP-4 e -2 no fluido folicular foi demonstrada, além de um aumento nas concentrações de estradiol no futuro folículo dominante, em bovinos (Mihm *et al.*, 2000; Austin *et al.*, 2001; Ginther *et al.*, 2002b). Baixas quantidades de IGFBP-2 aumentaram o número de receptores de LH em células da granulosa, parecendo estar associado ao estabelecimento do folículo dominante.

Foi sugerido que níveis reduzidos de IGFBP-2 em folículos dominantes estrogênicos, em bovinos, não são devido à proteólise aumentada, diferentemente do que é visto para IGFBP-4 e -5. A presença da regulação de IGFBP-4 através da degradação proteolítica IGF-dependente foi demonstrada no fluido folicular bovino (Mazerbourg *et al.*, 2000) e junto com a atividade proteolítica, a presença do IGFBP-5 foi mais marcante no folículo dominante (Rivera *et al.*, 2001; Rivera e Fortune, 2003a). A protease que degrada IGFBP-4 e -5 está associada à proteína plasmática associada à gestação A (PAPP-A) (Monget *et al.*, 2002; Rivera e Fortune, 2003b). Além disso, foi mostrado recentemente que PAPP-A é responsável pela degradação de IGFBP-2, IGF-dependente, levando a uma maior biodisponibilidade de IGF (Monget *et al.*, 2003). Expressão de RNAm de PAPP em células da granulosa de bovinos e ovinos foram máximas em folículos pré-ovulatórios e positivamente correlacionados com a expressão da aromatase e receptores de LH. Mudanças pós-translacionais do IGFBP também são conhecidas por sua ocorrência, e recentemente foi demonstrado que pelo menos 51 isoformas de IGFBP estão presentes no

fluido folicular bovino (Nicholas *et al.*, 2002), mas se eles têm algum papel fisiológico ou aumentam a susceptibilidade à ação de enzimas proteolíticas, não se sabe ainda.

Fatores de crescimento adicionais produzidos localmente incluem membros da superfamília de TGF $\beta$ , operando através de vias de sinalização. Certamente, BMP estão envolvidos na maturação folicular como indicado pelo aumento marcante na taxa de ovulação em ovelhas com uma mutação no receptor de BMP (Montgomery *et al.*, 2001; Monget *et al.*, 2002). Proteínas morfogenéticas de osso foram localizadas no folículo bovino (Glister *et al.*, 2004). Semelhantemente, em células da granulosa bovinas, BMP-4, -6, e -7 aumentaram a produção de estradiol, de inibina A, ativina A, e de folistatina (Glister *et al.*, 2004). Além disso, TGF $\beta$  e a ativina mostraram afetar a esteroidogênese e proliferação das células da granulosa bovina (Knight e Glister *et al.*, 2002). Entretanto, estes resultados fornecem evidência para um papel funcional de BMP, atuando junto a outros fatores localmente produzidos. Porém, os mecanismos exatos pelos quais estes fatores operam e o grau de necessidade de redundância ainda devem ser esclarecidos.

Antes de examinar os efeitos da nutrição sobre a função do folículo, é necessário revisar brevemente o conhecimento atual sobre o crescimento e dinâmica da onda folicular. Com o advento da ultra-sonografia ovariana trans-retal em tempo real a compreensão do crescimento e dinâmica da onda folicular melhorou significativamente. O crescimento de folículos antrais em bovinos acontece padrões semelhantes a ondas distintas durante o ciclo ovariano e período de anestro pós-parto (Roche *et al.*, 1998; Ginther, 2000). O aparecimento de cada onda nova é estimulado por um transitório (1-2 dias) aumento nas concentrações circulantes de hormônio folículo-estimulante (FSH), tanto vacas cíclicas (Adams *et al.*, 1992; Sunderland *et al.*, 1994) quanto em anestro (Stagg *et al.*, 1998).

Após os picos de concentrações de FSH, os níveis declinam durante vários dias enquanto os folículos crescem de aproximadamente 4,0 a 8,5 mm (Adams *et al.*, 1992; Ginther *et al.*, 1997). Em média, estes folículos crescem a uma taxa semelhante e então o grupo ou coorte de folículos em crescimento divergem para um único folículo dominante e um grupo de folículos subordinados. Tipicamente, a diferença de diâmetro inicial, define tanto o momento quanto a diferença no diâmetro entre os dois maiores folículos (Ginther *et al.*, 1997), geralmente acontece quando o folículo maior alcançar um diâmetro médio de 8,5 mm (Ginther *et al.*, 1997; 1998; 1999; 2001; Kulick *et al.*, 1999). Próximo ao início da divergência de diâmetro, o folículo maior é estabelecido como o folículo dominante (FD), aparentemente antes que o próximo folículo maior alcançasse um diâmetro semelhante. O domínio funcional é então estabelecido e o FD selecionado continua crescendo enquanto os folículos restantes que emergiram como parte da mesma onda folicular cessam

crescimento. O FD é distingível dos folículos subordinados por sua capacidade aumentada para produzir estradiol (Ginther *et al.*, 1997; Austin *et al.*, 2001), manutenção de baixas concentrações intrafoliculares de proteínas ligantes de fator de crescimento semelhante à insulina 2, 4 e 5 (IGFBPs) e folistatina (Austin *et al.*, 2001), um aumento nas concentrações intrafoliculares livres de IGF-I (Ginther *et al.*, 2001) e um aumento significativo no tamanho.

Os resultados de recentes estudos sugerem que algumas destas mudanças intrafoliculares, como também diferenças de tamanho, são evidentes às 33 h do aparecimento pico de FSH da onda pré-folicular e bem com avanço da divergência e aquisição de domínio funcional do folículo (Austin *et al.*, 2001). Em contraste, folículos destinados para se tornar atrésicos são caracterizados por uma perda de capacidade para produzir estradiol e uma produção aumentada de IGFBPs de baixo peso-molecular (Austin *et al.*, 2001). Eles cessam crescimento e eventualmente diminuem de tamanho com uma perda associada de sítios ligantes de gonadotrofinas (Ireland e Roche, 1983a,b) e o início da apoptose de células da granulosa. A seleção do FD acontece durante a diminuição das concentrações de FSH, e o FD mantém as concentrações de FSH até ovular ou entrar em processo de atresia, dependendo do padrão de secreção do hormônio luteinizante (LH) na ocasião. Durante as fases finais de seleção do FD, parece haver uma transição da dependência de FSH para LH, mas a causa do momento específico desta mudança é desconhecida. Porém, um FD selecionado expressa exclusivamente RNAm para receptores de LH nas células da granulosa (Bao e Garverick, 1998) que são fundamentais para permitir crescimento contínuo sob a estimulação do LH. As consequências são que o crescimento contínuo e produção de estradiol pelo FD é dependente aumento da freqüência dos pulsos de LH que, se prolongado, pode conduzir a persistência do FD (Sirois e Fortune, 1990; Stock e Fortune, 1993). Cada onda folicular tem um período de vida inerente de 7-10 dias de acordo com a progressão pelas diferentes fases do desenvolvimento: aparecimento, seleção, domínio e atresia ou ovulação. Em 95% de ciclos estrais há tanto 2 ou 3 ondas foliculares (Stagg, 2000) com os demais animais tendo até quatro ciclos de onda.

### **2.3 Efeito da nutrição sobre a taxa de crescimento e tamanho folicular**

Enquanto há uma vasta literatura sobre os efeitos da nutrição em vários parâmetros reprodutivos em ruminantes, há uma literatura relativamente escassa sobre os efeitos específicos da nutrição sobre a taxa de crescimento folicular, tamanho do folículo e dinâmica da onda.

### **2.3.1. Sub-nutrição crônica e dinâmica da onda folicular**

Murphy *et al.* (1991) foram os primeiros a determinar o efeito de diferentes níveis de ingestão dietética sobre o padrão de crescimento de folicular e função luteal durante o ciclo estral. Seu estudo envolveu novilhas alimentadas com 0,7, 1,1 ou 1,8% de peso corporal em MS por dia durante 10 semanas, estudando os efeitos da ingestão alimentar. Durante um ciclo de estral, começando aproximadamente 5 semanas após distribuição da dieta, o diâmetro de máximo e persistência do FD foi diminuída em novilhas apesar das mesmas continuarem a ovular. Observações semelhantes foram realizadas em estudos subsequentes que utilizaram novilhas (Quadro 2), onde uma diminuição gradual na taxa de crescimento, diâmetro máximo e persistência de FD aconteceu até o início do anestro (Rhodes *et al.*, 1995; Bossis *et al.*, 1999; Stagg, 2000), e vacas leiteiras pós-parto onde o balanço energético negativo foi associado a diminuição do diâmetro máximo (Lucy *et al.*, 1991). Durante o período de restrição alimentar, quando os animais estavam em balanço energético negativo, mas ainda eram cíclicos, nem a duração do ciclo estral, nem a proporção de animais com duas ou três ondas de ciclos estrais mudaram (Rhodes *et al.*, 1995; Stagg, 2000). Mensurações ultra-sonográficas dos corpos lúteos durante restrição nutricional crônica também demonstraram uma diminuição linear em tamanho com diminuição do peso corporal (Rhodes *et al.*, 1995; Bossis *et al.*, 1999), com o menor diâmetro de corpo lúteo ocorrendo no ciclo precedente ao anestro.

**Quadro 2.** Resumo dos efeitos da restrição alimentar crônica e re-alimentação em vários estudos que utilizaram novilhas - nível alimentar, detalhes do folículo e intervalo entre o início do anestro e retomada da ciclicidade.

	Rhodes <i>et al.</i> (1995) Rhodes <i>et al.</i> (1996)	Stagg (2000)	Bossis <i>et al.</i> (1999)
Peso inicial (Kg)	<i>Bos indicus</i> (307 kg)	Her x Fr (375±25 kg)	Angus x Hereford (378±15 kg)
Espécie / raça			
Nível alimentar: relativo à manutenção (M)	0,45	0,64	Alimentação para perder 1% do PC por semana.
Perda de peso (Kg/dia)	0,8	0,5	0,4
Efeitos sobre a taxa de crescimento folicular	Taxa de crescimento do 1º FD 5% inferior no ciclo estral final (anovulatório) comparado com o ciclo estral inicial.	Diminuição da taxa de crescimento dos FDs não-ovulatórios no anestro e durante a fase de anestro.	A taxa de crescimento (0,9±0,1 mm por dia x 1,4±0,1 mm por dia) dos folículos ovulatórios foi menor em novilhas com restrição alimentar durante os dois últimos ciclos antes da ausência de ovulação comparado as que receberam alimentação de manutenção.
Diâmetro Máximo	Diâmetro máximo no 1º FD 20% menor no ciclo final (anovulatório) comparado com o ciclo estral inicial.	Diâmetro do FD não-ovulatório diminuiu no momento do anestro, e durante a fase de anestro.	Diâmetro máximo (10,4±0,9 mm x 15,7±0,9 mm) dos folículos ovulatórios foi menor em novilhas restrição alimentar durante os últimos dois ciclos antes da ausência de ovulação comparado com as demais.
Persistência	Reduzida pela restrição alimentar.		
Intervalo do início da restrição dietética até o início do anestro	Entraram em anestro após 93±9 dias de restrição alimentar.	Entraram em anestro após 175±9 dias de restrição alimentar.	Entraram em anestro após 224 dias de restrição alimentar.
Variação de intervalos entre estros	48-132 dias	137-206 dias	Não apresentado.
% de peso perdido até o anestro	22% (70 kg)	24% (variando de 16 a 30%)	22%
Mudanças na taxa de crescimento do FD durante a re-alimentação	Aumentou linearmente até a retomada da ovulação.	Taxa de crescimento aumentou de 0,8 para 1,25 mm por dia da quinta onda anovulatória para primeira ovulatória.	Taxa de crescimento aumentou de 0,9 para 1,6 mm por dia desde o FD imediatamente após início da re-alimentação até o 1º FD ovulatório, respectivamente.
Mudanças no diâmetro máximo do FD durante re-alimentação	Aumenta linearmente até o momento da retomada da ovulação.	Diâmetro máximo aumentou de 9,0 para 12,5 mm da quinta onda anovulatória para a primeira ovulatória.	Diâmetro máximo aumentou de 9,2 para 15,3 mm desde o FD imediatamente após início da re-alimentação até o 1º FD ovulatório, respectivamente.
Intervalo do início da re-alimentação até a retomada da ovulação	54±9 dias (variando de 8-97 dias) após retorno da alimentação <i>ad libitum</i> .	Média ± DP: 109 ± 54 dias	Média de 57 e 80 dias para novilhas alimentadas para ganhar de 0,6 ou 1,5 kg por dia, respectivamente.
Peso corporal relativo na retomada do ciclo estral	101% do PC inicial na retomada da ovulação.	89% (variando de 77-109%) do peso original.	

Fonte: Adaptada de Diskin *et al.*, 2003.

### 2.3.2 Intervalo do início da restrição dietética até o anestro

O início do anestro nutricional demonstrou ocorrer após um período variável de tempo desde o começo de restrição nutricional. Um intervalo comum de 93 dias para início do anestro foi relatado por Rhodes *et al.* (1995), onde novilhas perderam aproximadamente 0,8 kg por dia, enquanto Stagg (2000) informou um intervalo comum de 175 dias com uma perda de 0,5 kg por dia, e Bossis *et al.* (1999) informaram um intervalo comum de 224 dias, onde as novilhas perderam aproximadamente 0,4 kg por dia. Destes três estudos, está claro que intervalo do início da restrição dietética até o início do anestro está inversamente relacionado à taxa de perda de peso vivo. Porém, início do anestro em novilhas cronicamente submetidas à restrição alimentar (Rhodes *et al.*, 1995; Stagg, 2000; Bossis *et al.*, 1999) e vacas (Richards *et al.*, 1989) parece acontecer constantemente quando animais

perdem em média 22-24% do seu peso corporal inicial. Uma característica adicional destes estudos foi a considerável variação individual entre animais, dentro dos estudos, no intervalo do começo de restrição dietética até o anestro, com alguns animais entrando em anestro após um período relativamente curto de restrição alimentar enquanto outros necessitaram de períodos significativamente mais longos (Quadro 2). A causa desta variação de animal-para-animal é desconhecida, mas pode ser de origem genética como sugerido por Rhodes *et al.* (1995). O escore de condição corporal no momento do início da restrição alimentar também poderia ser um fator que afetaria o intervalo do início ao anestro. Também é evidente que uma vez que as novilhas se entram em anestro, ondas folículos continuam crescendo e regredindo em intervalos regulares (Stagg, 2000; Bossis *et al.*, 2000) semelhante ao relatado em novilhas pré-púberes (Bergfeld *et al.*, 1994) e vacas em anestro pós-parto (Stagg *et al.*, 1998) e leiterias (Beam e Butler, 1999).

### **2.3.3 Dinâmica da onda folicular durante a re-alimentação**

Das evidências disponíveis (Quadro 2), parece que a re-alimentação de novilhas anovulatórias nutricionalmente induzidas resulta em um aumento gradual na taxa de crescimento, diâmetro máximo e persistência de FD. Também parece que à medida que as novilhas se aproximam do reinício iminente da ovulação há uma aceleração da taxa de crescimento e diâmetro máximo dos folículos (Stagg, 2000; Bossis *et al.*, 2000). Dados do estudo de Stagg (2000) são apresentados na Fig. 4. Esta tendência de crescimento acelerado e tamanho máximo é bem similar ao demonstrado por novilhas pré-púberes com restrição alimentar crônica (Bergfeld *et al.*, 1994). Em estudo posterior, com o momento da puberdade se aproximado, aumentaram o diâmetro máximo atingido por FDs sucessivos e estava associado com maiores concentrações de estradiol (Bergfeld *et al.*, 1994), sendo o resultado presumivelmente da diminuição do *feedback* negativo do estradiol na secreção de LH à medida que as novilhas alcançam a puberdade (Day *et al.*, 1986, 1987; Wolfe *et al.*, 1989). Os efeitos informados da restrição nutricional crônica e re-alimentação sobre as concentrações periféricas de gonadotrofinas e hormônios esteróides de diferentes estudos são resumidos na Quadro 3.

**Quadro 3. Resumo dos efeitos da restrição nutricional crônica e re-alimentação em vários estudos que utilizaram novilhas - efeitos sobre as concentrações de gonadotrofinas.**

	<b>Rhodes et al. (1995) Rhodes et al. (1996)</b>	<b>Stagg (2000)</b>	<b>Bossis et al. (1999) Bossis et al. (2000)</b>
LH	Não houveram diferenças nas características de secreção até ~17% de peso de PC e ~12% de diminuição no diâmetro máximo do 1º FD	Dentro de cada estágio do ciclo estral (emergência e dominância da 1ª onda, emergência da 2ª onda e fase folicular) não houveram diferenças nas características dos pulsos de LH no ciclo controle (antes da restrição alimentar) e 3º ou 6º ciclo estral após iniciada a restrição.  Durante a fase de recuperação, o estágio dos folículos em crescimento (emergente x dominância) não afetaram os pulsos de LH, mas a freqüência dos pulsos aumentou até o momento da retomada da ovulação.	Concentrações medias de LH entre novilhas com restrição alimentar foi menor no ciclo precedendo a ausência de ovulação que em novilhas alimentadas com dieta de manutenção.
	Não foram encontradas diferenças na pulsatilidade da secreção de LH entre o período 1 (antes do início da restrição alimentar) e o período 3 (após início do anestro nutricional).  As concentrações de LH foram 18% menores na emergência do 1º FD, e 40% menor após luteólise em amostras diárias de sangue coletadas no último ciclo anovulatório que no ciclo estral inicial.		A freqüência de pulso de LH no dia 15 dos dois últimos ciclos de 16 dias precedentes à ausência de ovulação foi menor em novilhas com restrição alimentar, mas não no dia 2.
FSH	Não foram detectadas diferenças no FSH antes da mudança da dieta até o início do anestro.	Não houve efeito da nutrição sobre a concentração de FSH relativa da onda folicular emergente durante qualquer um dos estágios reprodutivos durante o experimento.	A amplitude dos pulsos de LH foram menores em novilhas com restrição alimentar no ciclo estral precedente à ausência da ovulação, mas não no ciclo anterior a este.
	A concentração de FSH foi maior em amostras de sangue coletadas após luteólise no ciclo final (anovulatório) que no ciclo estral inicial.		Novilhas com restrição alimentar tiveram maior concentração, freqüência de pulso e amplitude de pulso que novilhas com alimentação de manutenção no dia 15 do ciclo precedente à ausência de ovulação.

Fonte: Adaptada de Diskin *et al.*, 2003.

**Quadro 4. Resumo dos efeitos da restrição nutricional crônica e re-alimentação em vários estudos que utilizaram novilhas - efeitos sobre as concentrações de estradiol e IGF-I.**

	<b>Rhodes et al. (1995) Rhodes et al. (1996)</b>	<b>Stagg (2000)</b>	<b>Bossis et al. (1999) Bossis et al. (2000)</b>
Estradiol	As concentrações de E2 foram similares no momento da emergência do 1º FD, mas tenderam a ser menores após no ciclo final (anovulatório) que no inicial.		Nos dois ciclos precedentes o período anloulatório, houve interação tratamento x ciclo x dia, onde animais com restrição alimentar tiveram menores concentrações, e não possuíram aumento pró-estro no último ciclo.
	IGF-I	Decréscimo linear nas concentrações de IGF-I até o início do anestro.	Novilhas com alimentação restriita tiveram menores concentrações que aquelas alimentadas com dieta de manutenção, e as concentrações foram menores no ciclo precedente ao período anovulatório.

Fonte: Adaptada de Diskin *et al.*, 2003.

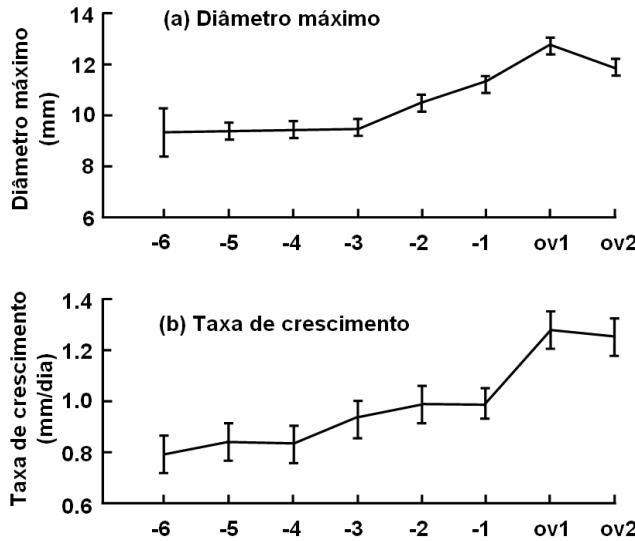


Fig. 4. Características dos folículos dominantes em novilhas com anestro nutricionalmente induzido durante as ondas precedentes à retomada da ovulação (ondas -6 a -1 e durante 1<sup>a</sup> (ov1) e 2<sup>a</sup> (ov2) onda ovulatória na retomada da ovulação.

Fonte: Stagg, 2000.

### 2.3.4 Sub-nutrição aguda

Com a exceção dos relatos de Mackey *et al.* (1999, 2000), há poucos trabalhos sobre os efeitos da restrição dietética aguda sobre a dinâmica da onda de folicular em bovinos. O principal achado do estudo inicial de Mackey *et al.* (2000) foi que a restrição nutricional aguda em novilhas cíclicas de 1,2 para 0,4 vezes a manutenção, iniciando um dia antes do fim de um programa de sincronização com progesterona, causou uma diminuição significante na taxa de crescimento e diâmetro máximo do FD na primeira onda do ciclo estral subsequente. Em contraste, o aumento da ingestão alimentar de 1,2 para 2,0 x manutenção não tiveram efeito, nem sobre taxa de crescimento, nem sobre o diâmetro máximo do folículo. Em um estudo subsequente, Mackey *et al.* (1999) também informaram uma redução no diâmetro máximo do folículo ovulatório após aproximadamente 3,5 dias de restrição dietética de 0,4 x manutenção. Além disso, restrição dietética de 1,2 para 0,4 x manutenção reduziu o crescimento novamente e diâmetro máximo da primeira onda de FD do ciclo estral subsequente. Em contraste com restrição dietética crônica, a restrição aguda teve muito mais efeito supressor imediato sobre a taxa de crescimento e diâmetro de máximo do folículo.

Um dos efeitos mais notáveis da restrição alimentar aguda de 1,2 para 0,4 vezes a manutenção vem da falha da ovulação do folículo dominante em 60% das novilhas após

13-15 dias de restrição apesar da oportunidade de ovular dois folículos dominantes sucessivos (Mackey *et al.*, 1999). Aparentemente, a restrição alimentar aguda severa não só tem um efeito imediato sobre a taxa de crescimento e diâmetro máximo do folículo, mas também compromete a capacidade do folículo ovular. Isto está em contraste com os efeitos de restrição dietética crônica menos severa onde o início do período anovulatório não acontece até um intervalo significativamente mais longo e até que os animais percam quantias significantes (22-24%) de massa corporal. Nos estudos de restrição dietética crônica realizados por Bossis *et al.* (1999) e Stagg (2000), os animais foram alimentados entre 0,6 e 0,7 vezes a manutenção, enquanto nos estudos de Mackey *et al.* (1999, 2000), as novilhas foram alimentadas com 0,4 vezes a manutenção. As diferenças observadas nas taxas de crescimento e diâmetro máximo do folículo e ovulação entre os estudos de restrição alimentar crônica e aguda sugerem que a resposta fisiológica para privação nutricional possa ser relacionada a um limiar abaixo do qual os efeitos sobre o desenvolvimento folicular são rápidos. Os resultados de estudos de privação nutricional aguda (Mackey *et al.*, 1999, 2000) e crônica (Murphy *et al.*, 1991; Bossis *et al.*, 1999; Stagg, 2000) sugerem que este limiar fica entre 0,4 e 0,6 vezes a manutenção. A relação entre tamanho de folículo e a probabilidade de ovulação foi calculada usando dados de Mackey *et al.* (1999) usando regressão logística (Fig. 5). Disto está claro que, uma vez que o diâmetro de máximo do folículo não excede 9 mm, tem menos de 20% de probabilidade de ovulação.

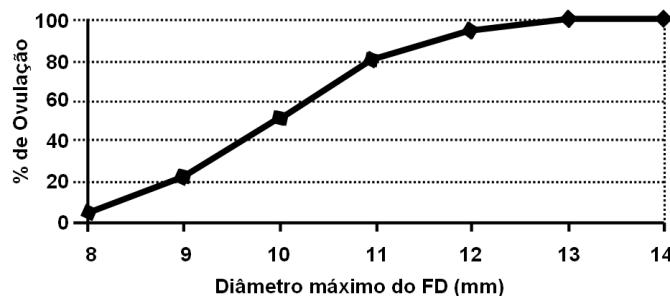


Fig. 5. Relação entre diâmetro do folículo dominante e probabilidade de ovulação em novilhas

Fonte: Diskin *et al.*, 2003.

## 2.4 Mecanismos pelos quais a nutrição afeta a dinâmica das ondas foliculares

Há evidências crescentes do efeito de nutrição sobre o desenvolvimento folicular (Garnsworthy e Webb, 1999). Por exemplo, mudanças a curto prazo no plano de nutricional têm demonstrado influenciar o recrutamento de pequenos folículos de antrais

pequeno (1 a 4 mm), sem afetar concentrações circulantes de FSH (Gutierrez *et al.*, 1997c; Armstrong *et al.*, 2001, 2002b; Gong *et al.*, 2002a), resultando em um número maior de ovulações após um tratamento superovulatório (Gong *et al.*, 2002a). A dieta também foi positivamente relacionada com a taxa de crescimento e tamanho do folículo ovulatório (Rhodes *et al.*, 1995; Bergfeld *et al.*, 1994; Mackey *et al.*, 1999; Bossis *et al.*, 2000; Armstrong *et al.*, 2001). Durante a lactação, o prolongamento de um balanço energético negativo é o principal fator que controla o crescimento folicular (Beam e Butler, 1999; Butler, 2000). Recentes estudos também realçaram a ligação entre a ingestão dietética e a competência de desenvolvimento do óvulo (O'Callaghan e Boland, 1999; Boland *et al.*, 2001). Fatores extra-ovarianos, como hormônios metabólicos (Fig. 6), e fatores de crescimento localmente produzidos são envolvidos na mediação de mudanças nutricionalmente induzidas na dinâmica folicular e qualidade do óvulo.

Especificamente, não há nenhum nutriente requerido para reprodução que não seja requerido para outras funções fisiológicas normais no corpo e, então, fica difícil determinar as funções específicas e mecanismos pelos quais a nutrição pode afetar as funções reprodutivas (Roche e Diskin, 1994). Potenciais locais de ação da nutrição sobre a função ovariana incluem efeitos sistêmicos a: (i) o nível hipotalâmico através da síntese e liberação de GnRH; (ii) a hipófise anterior através do controle da síntese e liberação de FSH, LH e hormônio de crescimento (GH); e (iii) ao nível ovariano por regulação do crescimento folicular e síntese de esteróides. Também há possíveis sítios locais de ação por efeitos da cascata de fatores de crescimento e suas proteínas ligantes dentro do ovário. Nenhum estudo foi administrado em bovino para determinar os efeitos específicos da nutrição sobre a função hipotalâmica. Os efeitos de GnRH foram deduzidos a partir de estudos das freqüências de pulsos de LH.

Há um número grande de fatores metabólicos que foram implicados no regulamento de função ovariana, vários são mostrados. Estes incluem hormônios e fatores de crescimento, como insulina, glucagon, leptina, GH, hormônios tireoidianos, e IGF hepático e suas proteínas ligantes, como também combustíveis metabólicos, como glicose, ácidos graxos, lipoproteínas de baixa e alta densidade (LDL e HDL, respectivamente), T3 (Triiodotironina) e T4 (Tiroxina).

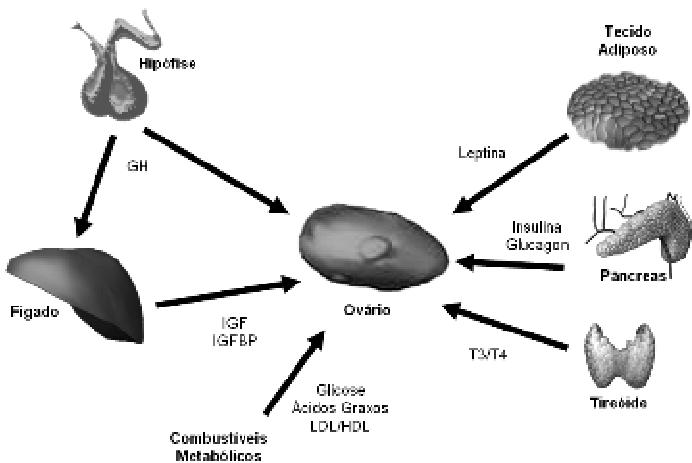


Fig. 6. Interação entre fatores metabólicos e função ovariana.

Fonte: Adaptada de Webb *et al.*, 2004.

### 2.4.1 Eixo hipotalâmico-hipofisário

#### 2.4.1.1 Efeitos da nutrição sobre o hormônio liberador das gonadotrofinas

No estudo de restrição alimentar aguda de Mackey *et al.* (1999), a falha da ovulação está sempre associada com a ausência de ondas pré-ovulatórias de LH e FSH, não necessariamente associada, entretanto, com a ausência de um aumento de estradiol pró-estro. De maneira interessante, a presença de um aumento na concentração de estradiol pró-estro parece depender do intervalo entre o início da restrição alimentar aguda e a ausência de ovulação. Quando o período anovulatório ocorre 4-5 dias após o começo da restrição dietética (0,4 x manutenção) a ausência de uma onda de LH não é freqüentemente associada com a ausência de aumento de estradiol pró-estro, enquanto o período anovulatório após um período mais longo (13-15 dias) sempre está associado com a ausência de um aumento de estradiol pró-estro. Isto sugere que os mecanismos que conduzem à ausência de ovulação possam operar diferentemente, dependendo da duração da restrição nutricional aguda. Recentes estudos em ovelhas (Moenter *et al.*, 1991; Skinner *et al.*, 1995; Skinner *et al.*, 1997) e gado (Gazal *et al.*, 1998) estabeleceram que o LH é libertado episodicamente da hipófise anterior em resposta à liberação pulsátil de GnRH do hipotálamo. Então, a ausência de uma onda de LH e FSH poderia ser mediada tanto pelo hipotálamo quanto pela hipófise anterior. Durante a luteólise espontânea, com a diminuição das concentrações de progesterona, a freqüência de pulsos de LH aumentam (Bergfeld *et al.*, 1996) em resposta ao aumento dos pulsos GnRH (Gazal *et al.*, 1998). Este

aumento da freqüência do pulso de LH estimula produção folicular de andrógeno (Hansel e Convey, 1983) e consequentemente aumenta a secreção de estradiol do FD.

O mecanismo exato através do qual as concentrações de estradiol crescentes estimulam uma onda de gonadotrofina não foi completamente elucidado, mas acredita-se que age em caminhos neuronais específicos dos neurônios de GnRH dentro do hipotálamo, conduzindo a um aumento na secreção de GnRH (Caraty *et al.*, 1995). No estudo de Mackey *et al.* (1999), quando o período anovulatório do primeiro FD do próximo ciclo estral aconteceu, a ausência de um aumento de estradiol pró-estro aumentou a concentração de estradiol sugere que havia pulsos de LH insuficientes para estimular a produção de andrógeno e consequentemente secreção de estradiol. Por falta do *feedback* positivo, baixas concentrações de estradiol poderiam prevenir o aumento de fase folicular com a pulsatilidade de GnRH e mudança no modo de secreção necessário para induzir uma onda de gonadotrofina. Após a luteólise, no final do ciclo estral antes de parada da ovulação, Bossis *et al.* (1999) observaram a ausência de um aumento da concentração de estradiol e uma supressão na freqüência e amplitude dos pulsos de LH. Isto sugere que há um *feedback* positivo insuficiente durante a fase de folicular para estimular produção de estradiol e em troca induzir uma onda de LH.

#### **2.4.1.2 Efeitos da nutrição sobre o hormônio luteinizante**

A regulação endócrina do LH é, igualmente complexa e pode variar com o estado fisiológico do animal. Em vacas no pós-parto (Stagg *et al.*, 1998) e em novilhas em anestro nutricional (Rhodes *et al.*, 1996; Bossis *et al.*, 1999), a ausência de ovulação foi devida à diminuição da freqüência dos pulsos de LH. Há evidências que bovinos em anestro são mais sensíveis aos efeitos do *feedback* negativo do estradiol que bovinos cíclicos (Acosta *et al.*, 1983; Garcia-Winder *et al.*, 1986; Chang e Reeves, 1987). Similarmente, em ovelhas, há também evidência de maior sensibilidade *feedback* negativo do estradiol durante período de carência nutricional (Foster e Olster, 1985) resultando em uma inibição da liberação de GnRH e uma mudança na reduzida secreção pulsátil de LH. Este aumento sensibilidade do *feedback* de estradiol em gado em anestro está em contraste com o animal normalmente cíclico, onde a progesterona é o principal hormônio de *feedback* negativo responsável pelo controle do padrão de liberação de LH (Day e Anderson, 1998).

Em novilhas submetidas a restrição alimentar crônica que, apesar de perder peso, continuam cíclicas, não há nenhuma evidência para sugerir que qualquer concentração média de LH ou freqüência de pulso de LH sejam afetadas de maneira adversa apesar dos animais terem perdido 17-18% do peso corporal inicial (Rhodes *et al.*, 1995; Stagg, 2000).

Mudanças no LH só ficam aparentes nos últimos dois ciclos estrais (Bossis *et al.*, 1999) precedendo imediatamente o início do anestro. Juntos, estes resultados sugerem que a diminuição da liberação pulsátil de LH e início do anestro aconteça rapidamente, possivelmente depois que quantidades críticas de gordura corporal foram catabolisadas. A concentração plasmática de estradiol após luteólise no último ciclo estral precedendo ausência de ovulação nutricional também é menor que em fases comparáveis de ciclos de ovulatórios iniciais (Rhodes *et al.*, 1996; Bossis *et al.*, 1999) e esta provavelmente é um reflexo da redução da freqüência do pulso de LH. Então, aparentemente que a restrição nutricional crônica reduz a freqüência de pulsos de LH em animais cíclicos que precede o início do anestro, mas que esta redução só é efetuada após ter ocorrido perda significativa de gordura corporal.

Foram relatadas uma diminuição na concentração de LH e uma supressão na freqüência de pulsos de LH em vacas em anestro nutricionalmente induzido (Richards *et al.*, 1989) e novilhas (Imakawa *et al.*, 1986), e ocorreu como resultado da secreção reduzida de GnRH do hipotálamo. Em borregos, pré-tratamento com estradiol a longo prazo durante sub-nutrição prolongada reduziu a magnitude do pico induzido de LH a apenas 20% do observados em cordeiros não cronicamente tratados com estradiol, sugerindo que baixos níveis de estradiol têm um forte efeito de *feedback* negativo em animais desnutridos (Foster e Olster, 1985). Evidências mais recentes sugerem que a sensibilidade hipofisária para pulsos de GnRH é diminuída durante sub-nutrição. Tatman *et al.* (1990) acharam que o conteúdo hipofisário de LH era mais baixo em ovelhas magras enquanto Kile *et al.* (1991) acharam que sub-nutrição suprimiu a síntese pituitária de LH assim como a concentração tanto de RNAm quanto de subunidades de LH seja menor em ovelhas ovariectomizadas submetidas à restrição alimentar. No entanto, administração pulsátil de GnRH foi capaz de restabelecer síntese e secreção de LH. Semelhantemente, vacas com dietas alimentares restritas liberaram mais LH em resposta a GnRH exógeno que vacas alimentadas com dietas nutricionalmente moderadas ou elevadas (Rasby *et al.*, 1991) e tiveram aumento nas concentrações médias de GnRH no pico de LH do hipotálamo (Rasby *et al.*, 1992) sugerindo que o maior secreção de LH na glândula hipofisária anterior e diminuição da secreção de LH em animais nutricionalmente restritos foi devido à redução na liberação de GnRH. Então, aparentemente, a supressão nutricionalmente induzida de LH pode ser modulada pelo menos em parte por fatores que afetam a geração de pulsos de GnRH resposta hipofisária ao GnRH, mas os mecanismos responsáveis precisam ser elucidados.

#### **2.4.1.3 Efeitos da nutrição sobre o hormônio folículo-estimulante**

Durante períodos de restrição de alimentar crônica, anestro nutricional e re-alimentação, Stagg (2000) encontrou que o padrão de liberação de FSH ao redor do aparecimento de cada nova onda sucessiva era semelhante. Concentrações de FSH aumentadas durante 3 dias antes de aparecimento da nova onda com valores máximos ocorrendo no dia anterior ao aparecimento da nova onda. Outros estudos que usam novilhas cronicamente restritas (Rhodes *et al.*, 1996; Bossis *et al.*, 1999) relataram concentrações mais altas de FSH após luteólise, no ciclo de estral que precede o início da ausência de ovulação. Bossis *et al.* (1999) associaram este aumento de FSH com uma concentração reduzida de estradiol após a luteólise no ciclo sem ovulação. Semelhantemente, Mackey *et al.* (2000) registraram maiores concentrações plasmáticas de FSH precedendo o aparecimento de onda folicular em novilhas que foram alimentadas com dietas que forneciam 0,4 vezes a manutenção comparadas com novilhas alimentadas a 1,2 ou 2,0 x manutenção, porém, as concentrações basais não foram afetadas. De forma interessante, concentrações plasmáticas de FSH também foram maiores em novilhas ovariectomizadas alimentadas com 0,4 vezes a manutenção que nas alimentadas com 1,2 ou 2,0 vezes.

Diferentemente do LH, há um pequeno armazenamento hipofisário de FSH (McNeilly *et al.*, 1995), e uma vez sintetizado é constitutivamente liberado (Farnworth, 1995). Isto sugere que o aumento na concentração de FSH registrada após restrição dietética em novilhas ovariectomizadas e cíclicas fosse devido aos efeitos sobre a hipófise anterior, resultando em aumento da síntese e liberação de FSH, e isto pode ter sido mediado por efeitos diretos no eixo de activina-inibina-folistatina nas gonadotrofinas. Alternativamente, o aumento do FSH poderia ser devido à amplitude aumentada do pulso de GnRH que também poderia estar causando o aumento da amplitude do pulso de LH, um efeito registrado por Mackey *et al.* (2000). Em novilhas inteiras, concentrações de FSH parecem não serem afetadas através da dieta, sugerindo que o FD de novilhas com restrição alimentar é igualmente eficiente, suprimindo a concentração de FSH como FD de novilhas alimentadas com quantidades de manutenção. Tanto em vacas leiterias pós-parto (Beam e Butler, 1997) e vacas de carne (Stagg *et al.*, 1998), o início do crescimento do folículo acontece com respeito à elevação das concentrações de FSH que acontece dentro dos primeiros 10 dias pós-parto. Não há nenhuma evidência para sugerir que o momento ou a magnitude desta primeira elevação pós-parto de FSH é afetada pelo balanço energético ou ingestão dietética. Além disso, todos estes estudos que examinaram os efeitos de nutrição sobre o FSH indicariam claramente que nem a síntese nem secreção de

FSH são adversamente afetadas através de restrição dietética crônica ou aguda, e que a falta de FSH não limita ovulação em novilhas submetidas à restrição nutricional.

#### **2.4.2 Efeitos da nutrição sobre os hormônios metabólicos**

Há muitas evidências que os hormônios metabólicos, como hormônio do crescimento, insulina, IGF-I e leptina têm papéis importantes no controle do desenvolvimento folicular ovariano e parecem ser mediadores importantes dos efeitos da ingestão dietética e, ou balanço energético na fertilidade de bovinos (Diskin *et al.*, 2003).

##### **2.4.2.1 Hormônio do Crescimento (GH)**

Tratamentos com GH demonstram ter um efeito significativo sobre o desenvolvimento do folículo ovariano tanto em vacas não-lactantes (Gong *et al.*, 1991, 1993) quanto lactantes (Lucy *et al.*, 1999; Lucy, 2003). A sugestão que o GH é envolvido na mediação dos efeitos da nutrição agindo diretamente sobre os folículos recrutados. RNAm que codifica o receptor do GH não foi descoberto em folículos bovinos (Lucy *et al.*, 1999), e alguns experimentos *in vitro* (Gong *et al.*, 1994; Jimenez-Krassel *et al.*, 2002) demonstraram que este não afeta a proliferação e esteroidogênese das células da granulosa bovinas em cultivos sem soro. Em contraste, um grande número de células luteais têm demonstrado expressar o receptor do GH e responder a tratamento com este hormônio (Lucy *et al.*, 1999).

Um estudo de dose-resposta *in vivo* com somatotrofina bovina demonstrou que o GH atua através do aumento da concentração periférica aumentada de insulina e/ou IGF-I para alterar desenvolvimento de folículos em novilhas (Gong *et al.*, 1997). Além disso, a associação entre mudanças agudas na ingestão dietética e o recrutamento de pequenos folículos antrais (1 a 4 mm) (Gutierrez *et al.*, 1997c; Armstrong *et al.*, 2001) aconteceu apesar da diminuição das concentrações circulantes de GH e sem diferenças nas concentrações periféricas de FSH entre tratamentos (Gutierrez *et al.*, 1997c). Em contraste, concentrações periféricas de GH são mais altas em vacas em lactação com elevado mérito genético para rendimento de leite, acompanhado um atraso da primeira ovulação pós-parto, comparado com uma linhagem de inferior mérito genético (Webb *et al.*, 1999b; Gong *et al.*, 2002b). Estes resultados sugerem que o GH atua através de outros hormônios metabólicos, como insulina e IGF-I, para influenciar desenvolvimento de folicular.

Tecidos reprodutivos, como hipotálamo, hipófise, corpo lúteo e folículo ovariano e útero contêm RNAm para receptores de GH (Kirby *et al.*, 1996; Lucy *et al.*, 1998) mas não está claro se eles contêm receptores de GH. Em bovinos, há evidência que receptores de

GH estão presentes nas células da granulosa folicular, mas sua abundância é significativamente menor que no tecido do corpo lúteo (Lucy *et al.*, 1999). Restrição alimentar demonstrou aumentar as concentrações sanguíneas de GH em bovinos (Armstrong e Benoit, 1996).

Em novilhas com anestro nutricionalmente induzido, tanto a concentração sérica média quanto a amplitude do pulso de GH foram aumentados durante os últimos dois ciclos estrais antes do início do anestro enquanto que a freqüência de pulso permanecia inalterada (Bossis *et al.*, 1999). Em gado, os principais efeitos do GH na reprodução parecem ser devido ao seu efeito regulador hepático da síntese e secreção de IGF-I sem evidências do momento síntese e secreção de IGF-I dependente do GH ou realmente um efeito direto do GH sobre os folículos bovinos (Gong, 2002; Lucy *et al.*, 1999). Isto está de acordo com a observação que mulheres com uma mutação no receptor de GH (Menashe *et al.*, 1991) e gado com expressão anormal do receptor de GH (Chase *et al.*, 1988) são capazes de reproduzir, embora com taxas inferiores. Isto conduziu Lucy *et al.* (1999) a concluirem que o GH tem um papel de facilitador ao invés de obrigatório na reprodução.

#### **2.4.2.2 Insulina**

Há crescentes evidências que associam a diminuição da fertilidade em vacas leiteria no pós-parto com o balanço energético negativo e diminuição das concentrações de IGF-I e insulina (Beam e Butler, 1999; Butler, 2000). Vários estudos demonstraram a importância da insulina como um sinal mediador dos efeitos de mudanças agudas na ingestão de nutrientes sobre a dinâmica folicular em bovinos. Concentrações de insulina circulantes exibem a variação durante o dia, mas também mudanças durante o ciclo estral com aumentos significativos concentrações durante o período pré-ovulatório (McCann e Hansel, 1986; Armstrong *et al.*, 2001). O estrogênio é um dos principais fatores que mediam essas mudanças, como os aumentos nas concentrações de insulina no plasma associada a aumento de estrogênio associado ao desenvolvimento do folículo dominante. O estrogênio tem demonstrado estimular tanto a expressão de RNAm que codifica insulina quanto sua secreção no pâncreas em várias espécies (Morimoto *et al.*, 2001).

O início da primeira ovulação é atrasado em vacas leiterias selecionadas por elevado mérito genético pelo seu alto rendimento de leite e isso demonstra estar associado a uma mais baixa concentração de insulina circulante (Butler, 2000). Por outro lado, dietas alimentares preparadas especificamente para aumentar as concentrações de insulina circulantes durante o início da lactação podem adiantar a primeira ovulação pós-parto (Gong *et al.*, 2002b). A infusão de insulina em novilhas aumentou tanto o diâmetro do

folículo dominante (Simpson *et al.*, 1994) quanto a taxa de ovulação em animais com restrição energética (Harrison e Randel, 1986).

Um grande número de células da granulosa e da teca têm demonstrado em estudos *in vitro* a ação direta de fatores metabólicos (Webb *et al.*, 1999a,c; Lucy, 2000; Spicer *et al.*, 2002; Armstrong *et al.*, 2003). De fato, estudos de cultivos celulares demonstraram que células da granulosa bovinas são extremamente dependentes da presença de concentrações fisiológicas de insulina (Gutierrez *et al.*, 1997b; Glister *et al.*, 2001). Além disso, foi demonstrado que a dieta induz a aumentos em concentrações circulantes de insulina com aumento da produção de estradiol em células da granulosa cultivadas de pequenos folículos antrais (1 a 4 mm) (Armstrong *et al.*, 2002b), demonstrando uma ação direta de hormônios metabólicos sobre a função do folículo.

Há evidências significativas que a restrição dietética e o balanço energético negativo reduzem as concentrações circulantes de insulina (Vizcarra *et al.*, 1998; Mackey *et al.*, 2000; Sinclair *et al.*, 2002). Além do seu papel no metabolismo dos carboidratos, a insulina serve também como um sinal metabólico que influencia a liberação de LH pela hipófise anterior (Monget e Martin, 1997) e demonstrou fazer um papel regulador responsabilidade ovariana a gonadotrofinas. Recentemente, Sinclair *et al.* (2002) demonstraram que vacas em anestro pós-parto com baixas concentrações plasmáticas de insulina foram incapazes de ovular um folículo dominante em relação a vacas lactentes, diferentemente de vacas com restrição, com concentrações plasmáticas mais elevadas de insulina, apesar de um aumento na freqüência do pulso de LH. Os resultados deste estudo estão de acordo os recentes estudos de Gong *et al.* (2001, 2002) que demonstraram que vacas leiterias alimentadas com uma dieta que aumentou concentrações circulantes de insulina durante os primeiros 50 dias pós-parto tiveram intervalo de anestro mais curto, independente de qualquer efeito no LH ou FSH e sem afetar a produção de leite ou balanço energético. Os três estudos posteriores sugeriram que a insulina teve um efeito direto ao nível ovariano. A inabilidade para responder ao aumento da freqüência de pulso do LH pode ser devida à ausência de receptores de LH nas células da granulosa que são conhecidos por ser dependentes das ações combinadas de FSH e 17 $\beta$ -estradiol (Bao e Garverick, 1998; Webb *et al.*, 1999). 17 $\beta$ -estradiol folicular se torna dependente da produção de andrógeno pelas células da teca estimuladas pelo LH, baseado em estudo *in vitro* de Stewart *et al.* (1995), aparentemente pelo aumento de insulina e IGF-I. Então, baixas concentrações plasmáticas de insulina poderiam reduzir a produção de androgênio e estradiol e assim poderiam comprometer a habilidade dos folículos para adquirir receptores de LH.

#### **2.4.2.3 Fatores de crescimento semelhante à insulina**

A insulina promove um aumento evidente da atividade ovariana, o que está relacionado à mudanças nas concentrações sistêmicas de IGF-I, induzidas nutricionalmente (Webb *et al.*, 1999c). O fígado é a principal fonte do IGF-I sistêmico, e o GH é o regulador primário da expressão gênica e secreção hepática de IGF-I (Etherton e Bauman, 1998). Utilizando a regulação hiperinsulêmica-glicêmica, que mantém as concentrações basais de glicose em torno de 10%, a insulina tem mostrado aumentar as concentrações plasmáticas de IGF-I em vacas leiteiras em lactação (McGuire *et al.*, 1995) e tem mostrado possuir interação com GH no controle hepático da produção de IGF-I (Molento *et al.*, 2002). Em vacas de leite, diminuição das concentrações circulantes de IGF-I está associada tanto ao período pré-parto quanto a restrição alimentar aguda (Kobayashi *et al.*, 1999, 2002). Essas mudanças têm sido associadas com a diminuição da expressão de receptores de GH no fígado durante o período pré-parto, mas não durante restrições alimentares agudas (Kobayashi *et al.*, 2002).

Mudanças nos níveis circulantes dos componentes do sistema IGF-I têm sido induzidas por mudanças na dieta, conforme descrito na literatura (Clemmons e Underwood, 1991; McGuire *et al.*, 1992; Thissen *et al.*, 1994; Monget e Martin, 1997), sendo as concentrações circulantes de IGF-I correlacionadas positivamente com o nível alimentar (Vandehaar *et al.*, 1995; Bossis *et al.*, 2000; Armstrong *et al.*, 2001; Rausch *et al.*, 2002). Mudanças severas no consumo alimentar aumentam as concentrações circulantes de IGF-I logo após uma ovulação induzida artificialmente em novilhas submetidas a sincronização do estro e em novilhas não lactantes alimentadas com o dobro de suas necessidades de manutenção, quando comparado às concentrações de IGF-I presentes em animais alimentados ao nível de manutenção. Esses resultados, quando combinados com estudos anteriores (Gutierrez *et al.*, 1997c; Armstrong *et al.*, 2001, 2002b), mostram variações experimentais consideráveis relacionadas à magnitude das mudanças nas concentração de IGF-I associadas com as mudanças do estado nutricional, sugerindo que outros sistemas endócrinos estejam interagindo com a regulação hepática de GH e secreção de IGF-I. O estrógeno também tem sido associado a mudanças na insulina, mostrando aumentar as concentrações de GH (Grigsby e Trenkle, 1986), que estimula a secreção de IGF-I (Richards *et al.*, 1991), e aumenta as concentrações circulantes de IGF-I em vacas ovariectomizadas (Simpson *et al.*, 1997).

A biodisponibilidade de IGF-I circulante e sua taxa de liberação plasmática é controlada por IGFBP (Thissen *et al.*, 1994). Concentrações periféricas de proteínas de ligação são reguladas pelo consumo alimentar, e um exemplo disso é a proteína IGFBP-3,

que tem sido positivamente correlacionada com o consumo alimentar (Rausch *et al.*, 2002) e aumento da taxa de crescimento em bovinos, quando em altos níveis (Vestergaard *et al.*, 1995). Esses efeitos podem ser modulados por outros fatores, como observado em bovinos de leite, nos quais a insulina tem sido associada à diminuição das concentrações periféricas de IGFBP-2, mas não afetou as concentrações de IGFBP-3 (McGuire *et al.*, 1995). Hormônios metabólicos podem, além disso, afetar diretamente o sistema follicular de IGF, aumentando a resposta das células da granulosa bovina de pequenos folículos antrais ao FSH (Armstrong *et al.*, 2001). Especificamente, existe a hipótese de que um aumento na energia alimentar diminua as concentrações estáveis de RNAm codificante de IGFBP-2 e -4 em pequenos folículos antrais, que aumenta a biodisponibilidade de IGF-II produzido localmente e sistemicamente derivado do IGF-I nesses folículos (Webb *et al.*, 2003; Armstrong *et al.*, 2003).

Concentrações plasmáticas de IGF-I são positivamente associadas à condição corporal e ingestão de nutrientes (Houseknecht *et al.*, 1988; Yelich *et al.*, 1996) e baixas concentrações de IGF-I são associadas com um aumento do intervalo entre partos em vacas (Rutter *et al.*, 1989; Nugent *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1997) e com atraso na puberdade (Granger *et al.*, 1989), mas aparentemente não há nenhum efeito direto sobre a pulsatilidade do LH (Rutter *et al.*, 1989). Semelhantemente, em vacas leiterias, onde o primeiro FD pós-parto a ovular, concentrações de IGF-I são mais altas nas primeiras 2 semanas após parição que em vacas onde falha a ovulação do primeiro FD (Beam e Butler, 1997). Stagg *et al.* (1998) estabeleceram que as concentrações plasmáticas de IGF-I aumentam linearmente até o dia de primeira ovulação em vacas de lactantes, enquanto concentrações de GH diminuem. Usando o modelo de novilhas com restrição alimentar, Bossis *et al.* (2000) e Stagg (2000) informaram uma diminuição linear nas concentrações plasmáticas de IGF-I do início da restrição até o início anestro. Durante re-alimentação, as concentrações de IGF-I aumentaram linearmente até retomar a ovulação, mas de forma interessante concentrações tinham alcançado apenas 50% dos seus valores pré-restrição no momento em que a retomada da ovulação aconteceu (Fig. 7). Cumulativamente, estes estudos sugerem fortemente que esses efeitos nutricionais sobre a retomada da ovulação em vacas pós-parto, na supressão e no recomeço de ciclos ovulatórios após restrição dietética e re-alimentação, respectivamente, são mediados, pelo menos parcialmente, pelo IGF-I.

Os potenciais sítios de ação e mecanismos exatos pelas quais IGF-I afeta a função reprodutiva não estão claros. Concentrações aumentadas de IGF-I poderiam estimular diretamente a proliferação ou capacidade de esteroidogênica das células da teca (Spicer e

Stewart, 1996) e ou células da granulosa (Spicer *et al.*, 1993). Também foi mostrado que IGF-I pode afetar diretamente a função hipofisária (Wilson, 1995; Soldani *et al.*, 1995) e hipotalâmica (Hiney *et al.*, 1991). Também são correlacionadas as concentrações no fluido folicular de IGF-I em grandes folículos bovinos com concentrações circulantes de IGF-I (Echternkamp *et al.*, 1990). É bem documentado por estudos de cultivo *in vitro* (Spicer e Stewart, 1996; Stewart *et al.*, 1996) que o IGF-I aumenta o número de sítios ligantes de androstenedione estimulado pelo LH e produção de progesterona através das células da teca. Isto sugere que o IGF-I tenha um papel no aumento da responsabilidade da célula folicular ao LH que em troca aumentaria produção folicular de estradiol que é um pré-requisito para ovulação acontecer.

Em bovinos, assim como em outras espécies, além de causar diminuições nas concentrações circulantes de insulina e IGF-I, sub-nutrição também causa uma diminuição nas concentrações circulantes de proteínas ligantes (IGFBPs) (Webb *et al.*, 1999). Assim como IGFBPs aumentam o transporte e a meia vida das IGFs, baixas concentrações sanguíneas IGFBP provocadas pela sub-nutrição vão, desta forma, limitar a disponibilidade de IGFs para as células alvo no folículo e consequentemente limitar sua habilidade interagir com gonadotrofinas hipofisárias para estimular proliferação celular e esteroidogênese.

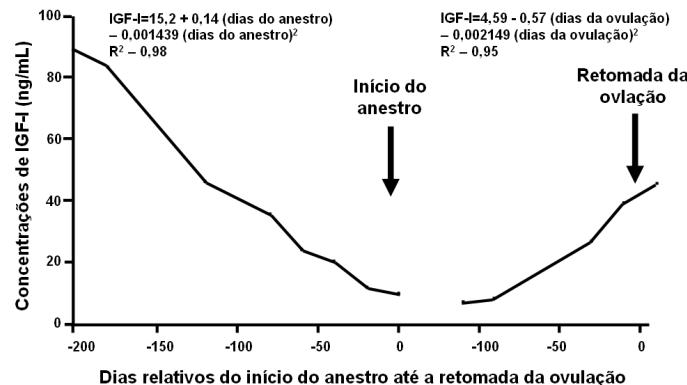


Fig. 7. Concentrações plasmáticas médias de IGF-I em novilhas durante restrição alimentar e re-alimentação normalizada relativa ao início do anestro e retomada da ovulação.

Fonte: Stagg, 2000.

#### 2.4.2.4 Glicose

Evidências em várias espécies destacam a importância da glicose como um mediador dos efeitos nutricionais na reprodução. Diferentemente de animais monogástricos, as concentrações sanguíneas de glicose são muito mais estáveis em bovinos. Em vacas em lactação, há uma elevada demanda por glicose como substrato

primário para síntese mamária de lactose. Concentrações sanguíneas de glicose são inversamente relacionadas à ingestão de energia (Yelich *et al.*, 1996) e estão reduzidas quando em animais de alto rendimento em leite em relação aos de baixo (Snijders *et al.*, 2001). Bucholtz *et al.* (1996) sugeriram que a disponibilidade de glicose afeta secreção de LH agindo dentro do sistema nervoso central em local de detecção periférico ao neurônio do GnRH, desde que depleção de glicose não prejudique a glândula hipófise ou o sistema neurosecretório de GnRH diretamente. Murahashi *et al.* (1996) encontraram que sensor central na base inferior do cérebro, a área postrema, poderia ser um sensor de glicose importante na modulação de secreção de LH. Recentes estudos estabeleceram que a disponibilidade de glicose influencia tanto a tônus quanto os modos da onda de secreção de LH, presumivelmente por seus efeitos sobre o GnRH. Em ovelhas tornadas hipoglicêmicas transitoriamente por um tratamento com insulina, o início da onda de LH foi atrasado, mas infusão de glicose associada à insulina previou a hipoglicemia e restabeleceu o momento normal do pico estrogênio induzido pelo LH que o controla (Medina *et al.*, 1998). Em uma recente revisão, Foster e Nagatani (1999) sugerem que glicose pode ser um sinal metabólico que fornece informação para o controle da secreção de GnRH. A glicose parece estar centralmente envolvida na liberação de LH e assim refletindo modulando a liberação de GnRH.

#### **2.4.2.5 Leptina**

Há evidências crescentes que a leptina que é produzida principalmente através dos adipócitos podem agir como um sinal ligando o status nutricional com o desempenho reprodutivo (Keisler *et al.*, 1999; Spicer, 2001). Concentrações periféricas de leptina têm sido relacionadas à condição corporal de vacas em lactação (Ehrhardt *et al.*, 2000), e ao nível alimentar, em vacas não-lactantes (Delavaud *et al.*, 2002). Jejum por um curto período, que diminui as concentrações séricas de insulina e IGF-I também demonstraram diminuir a expressão de RNAm que codifica leptina em adipócitos (Amstalden *et al.*, 2000). Mudanças agudas na ingestão de alimento também levam a alterações nas concentrações de leptina circulantes, com máximas concentrações de leptina sendo observadas 2 dias após o início da alimentação com duas vezes o nível de manutenção (Armstrong *et al.*, 2003). De fato, a leptina inibe a interação sinérgica entre as gonadotrofinas e a insulina (Spicer, 2001).

Em um sistema de cultivo sem soro, foi demonstrado recentemente que concentrações fisiológicas de leptina inibem o estradiol e a produção de androstenediona pela granulosa e células de teca, respectivamente (Armstrong *et al.*, 2003). Estes resultados

são semelhantes àqueles previamente descritos que demonstraram que a leptina inibe a ação de insulina na esteroidogênese (Spicer e Francisco, 1997; Spicer *et al.*, 2001).

Muitas pesquisas recentes focalizaram a leptina como um regulador da função reprodutiva e particularmente como um mediador dos sinais nutricionais (Clarke e Henry, 1999; Williams *et al.*, 2002). A leptina é bem conhecida como um modulador do comportamento alimentar, que elevadas concentrações plasmáticas levam a supressão do apetite (Foster e Nagatani, 1999). O RNAm do receptor de leptina foi descoberto no ovário, testículos, útero e glândula hipófise de ratos e humanos (Houseknecht *et al.*, 1998).

A leptina é secretada em um padrão pulsátil tanto em ovelhas (Blache *et al.*, 2000) quanto em vacas (Wylie *et al.*, 2001). Mudanças crônicas e agudas na nutrição afetam as concentrações sistêmicas de leptina em ovelha (Blache *et al.*, 2000) e vacas (Ehrhardt *et al.*, 2000). Em vacas leiterias, a eliminação do déficit energético no início da lactação está associada com uma duplicação das concentrações plasmáticas de leptina (Block *et al.*, 2001). Neste estudo, as concentrações plasmáticas de leptina são correlacionadas positivamente com as concentrações plasmáticas de insulina e glicose e negativamente com as concentrações plasmáticas de GH e AGNEs. Amstalden *et al.* (2000) acharam que o jejum por curto prazo (48 h) em novilhas próximo à puberdade (pesando 315 kg) diminui expressão do gene da leptina e leptina circulante concomitante às reduções nas concentrações circulantes de insulina e IGF-I e freqüência de pulso de LH. Foi proposto que os efeitos da leptina poderiam ser mediados em parte pelo NPY (Neuropeptídeo Y) que demonstrou regular a liberação de gonadotrofinas inibindo a secreção de LH em ovelhas (McShane *et al.*, 1992). Além disso, RNAm do receptor de leptina foi encontrado no hipotálamo da ovelha co-habitando com o NPY em neurônios localizados no núcleo arcuato (Williams *et al.*, 1999). Cumulativamente, estes estudos sugerem que a leptina tem um papel na ligação entre o balanço energético e função reprodutiva no gado.

#### **2.4.2.6 Neuropeptídeos**

Peptídeos opióides endógenos estão envolvidos no regulamento da ingestão alimentar têm demonstrado inibir a liberação de LH durante a fase de luteal do ciclo de estral em bovinos (Mahmoud *et al.*, 1989). Os peptídeos opióides foram implicados na neuromodulação da liberação de GnRH em ovelhas (Horton *et al.*, 1987; Currie *et al.*, 1993), e outros acharam que há o aumento da concentração plasmática de LH após tratamento com o antagonista do receptor do opióide, naloxone, vacas pós-parto (Gregg *et al.*, 1986; Whisnant *et al.*, 1986a,b). Também há a evidência que os peptídeos opióides endógenos são envolvidos na mediação da supressão nutricionalmente induzida de LH em

vacas leiteiras pós-parto (Canfield e Butler, 1990). Um estudo mais recente mostrou que esta resposta é correlacionada positivamente com a ingestão energética (Sinclair *et al.*, 1995). Conseqüentemente, peptídeos opióides provêm um possível mecanismo pelo qual restrição nutricional pode alterar o pulso gerador de GnRH, possivelmente mediado pelo neuropeptídeo Y (NPY), que também parece fazer um papel fundamental na regulação da ingestão alimentar e, por conseguinte, no balanço energético em ruminantes (McShane *et al.*, 1993).

O neuropeptídeo Y é um conhecido potente inibidor potente da liberação de LH e, diferentemente da leptina, é um potente estimulador da ingestão alimentar (Houseknecht *et al.*, 1998). Os resultados de estudos com ovelhas em anestro de nutricional (Morrison *et al.*, 1999) sugerem que o NPY pode agir como um importante neurotransmissor que interagindo entre a nutrição e o eixo reprodutivo e do crescimento. Concentrações de NPY aumentam drasticamente no fluido cérebro-espinal (CSF) durante sub-nutrição e têm demonstrado modular negativamente a secreção de LH quando centralmente infundido (Gazal *et al.*, 1998). Semelhantemente, McShane *et al.* (1992, 1993) informaram que tanto as concentrações de fluido cérebro-espinal (CSF) quanto a expressão hipotalâmica do NPY são elevados em crias de ovelhas com restrição dietética que exibem secreção hipofisária mínima de LH. Recentemente, foi demonstrado que infusões intracerebroventriculares de NPY suprimem secreção de LH em vacas ovariectomizadas com implantes de estradiol em associação com reduções na amplitude e freqüência do pulso de GnRH no fluido cérebro-espinal (Gazal *et al.*, 1998). Cumulativamente, todos estes estudos mostraram que o NPY é um importante neurotransmissor que faz a interação entre a nutrição e o eixo reprodutivo e de crescimento.

Em resumo, alterações nutricionalmente induzidas em vários hormônios metabólicos podem ser relacionados com mudanças na função ovariana. Esteróides ovarianos também podem modular a ação e produção destes hormônios metabólicos, resultando em ciclos de *feedback* positivos e negativos. Além disso, mudanças nutricionalmente induzidas nas concentrações destes hormônios metabólicos têm o potencial de interagir diretamente com as gonadotrofinas para regular o crescimento do folículo e esteroidogênese, desde, como discutido, as gonadotrofinas provêm a rota primária para desenvolvimento de folículos antrais.

### **3. JUSTIFICATIVA**

A espécie caprina é de elevada importância econômica para a produção de carne, leite e de pele em diversos países do mundo. Na região Nordeste, onde concentra-se cerca de 93,2% da população caprina do Brasil (IBGE, 2002), a exploração desse rebanho é caracterizada por um baixo nível de produção e reprodução. O manejo nutricional é ligado, sobretudo, na utilização da vegetação natural (caatinga) e à sua variação quantitativa e qualitativa no decorrer do ano, o que torna escassa a utilização das biotécnicas reprodutivas como forma de aumentar a produtividade. O *status* nutricional é um determinante fundamental da eficiência e capacidade reprodutiva. Para assegurar a produtividade, deve-se garantir o bom desempenho das funções reprodutivas.

A eficiência reprodutiva dos ruminantes é o resultado da fertilidade, prolificidade e sobrevivência das crias, fatores estes que são fortemente influenciados pela nutrição. A disponibilidade de nutrientes tem sido correlacionada com melhoria dos indicies reprodutivos e produtivos em ruminantes, sendo fundamental no controle da eficiência de tecnologias voltadas para a reprodução. Apesar do seu reconhecido valor, há uma escassez de dados na literatura sobre os efeitos da nutrição sobre a reprodução dos caprinos. No que concerne à fisiologia da reprodução e a sua relação com a nutrição, a literatura é voltada quase que completamente aos ovinos de clima temperado.

Com o crescente interesse na caprinocultura, torna-se de fundamental importância o conhecimento dos efeitos da nutrição sobre a fertilidade, oócito e processo de foliculogênese terminal, no sentido de aumentar a resposta dos caprinos a tratamentos de superovulação e assim viabilizar a utilização de biotécnicas reprodutivas como a múltipla ovulação e transferência de embriões. Enquanto há uma vasta literatura sobre os efeitos da nutrição em vários parâmetros reprodutivos em ruminantes, há uma literatura relativamente escassa sobre os efeitos específicos da nutrição sobre a taxa de crescimento folicular, tamanho do folículo e dinâmica da onda. Essa escassez de informações é mais evidente em relação aos caprinos e principalmente no que concerne às cabras do Nordeste do Brasil.

Para o produtor, torna-se de importância fundamental a disponibilidade e o custo da suplementação alimentar durante o ano, sobretudo na estação seca, onde deve-se otimizar a

distribuição de recursos alimentares limitados que caracterizam muitos dos sistemas de criação de caprinos. Nesse sentido, parece importante o desenvolvimento de um protocolo de estimulação energética tendo como objetivo maximizar a resposta ovulatória e a produção de embriões *in vivo* em cabras Moxotó.

#### **4. HIPÓTESE CIENTÍFICA**

O maior nível energético na alimentação influencia positivamente os processos de seleção, recrutamento e desenvolvimento folicular, afetando, desta forma, a resposta ovulatória em cabras Moxotó submetidas a um tratamento padrão de superovulação.

## **5. OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Fornecer um protocolo de estimulação energética simples e eficiente para estimulação e manutenção do nível energético, proporcionando uma melhor resposta a um tratamento padrão de superovulação, aumentando o desempenho reprodutivo.

### **Objetivos Específicos**

- Comparar os níveis de insulina no plasma durante o período de estimulação energética;
- Estudar o efeito das diferentes estratégias nutricionais sobre a resposta ovulatória de cabras Moxotó submetidas a um tratamento padrão de superovulação com pFSH através da dosagem de  $17\beta$ -estradiol;
- Avaliar a influência das diferentes estratégias sobre o estro.

## **6. CAPÍTULO 1**

### **UTILIZAÇÃO DA INSULINA EM CABRAS DA RAÇA MOXOTÓ SUBMETIDAS A UM TRATAMENTO DE SUPEROVULAÇÃO**

*(Use of the insulin in Moxotó goats submitted to superovulation treatment)*

*Anais da 43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2006. João Pessoa,  
2006. (Aceito para publicação)*

## **Utilização da insulina em cabras da raça Moxotó submetidas a um tratamento de superovulação**

Almeida, A.P.<sup>1</sup>; Souza A.L.<sup>1</sup>; Lima, I.M.T.<sup>1</sup>; Magalhães, D.M.<sup>1</sup>; Silva, J.D.A.<sup>1</sup>; Almeida, K.C.<sup>1</sup>; Pinheiro, E.S.P<sup>1</sup>; Moura, R.R.<sup>1</sup>; Andrioli, A.<sup>2</sup>; Freitas, V.J.F.<sup>1</sup>; Rondina, D.<sup>1</sup>.

1 Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil.

2 Embrapa Caprinos, Ceará, Brasil.

### **Resumo**

A disponibilidade de nutrientes é um fator modulador da atividade reprodutiva. A quantidade de energia é regulada através do fluxo de glicose mediado pela insulina. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a utilização da insulina para estimulação e manutenção do nível energético, proporcionando um melhor desempenho reprodutivo em cabras nativas. Foram utilizadas 12 fêmeas caprinas da raça Moxotó, com alimentação correspondente a 1,5 vezes o requerimento de manutenção. Estas foram divididas em dois grupos: Controle (n=5), onde a alimentação foi mantida e, Insulina (n=7), no qual foram administradas 3 doses de insulina (0,2 UI / kg de PV / dia) além da alimentação, paralelamente ao protocolo de superovulação. O tratamento superovulatório consistiu em seis aplicações decrescentes de pFSH (120 mg), associado ao uso de esponjas vaginais por 11 dias. Oito dias após a remoção da esponja, foram realizados os procedimentos de laparoscopia para avaliação da resposta ovariana. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação ao número de animais em estro e respondendo ao tratamento superovulatório. O grupo Insulina foi significativamente superior ao grupo Controle no total de ovulações (83 vs. 58, P<0,05). A administração de insulina mostrou-se um método eficiente para aumentar a resposta ovulatória de cabras da raça moxotó em um tratamento de sincronização do estro e superovulação.

**Palavras-chave:** Caprinos, nutrição, raça nativa, resposta ovariana, suplementação alimentar

## **Introdução:**

É conhecido que a disponibilidade de nutrientes é um fator regulador da atividade reprodutiva, sendo o potencial reprodutivo das espécies domésticas, entre elas a caprina, influenciado pelos efeitos nutricionais a curto e longo prazo. Sabe-se também da influência da nutrição sobre os processos de gametogênese e recrutamento folicular (Boland “et al”., 2001). Ovelhas submetidas a infusão de glicose (Downing “et al”., 1995) têm elevada sua taxa de ovulação em função da disponibilidade de energia, sendo os efeitos nutricionais na taxa de ovulação regulados através do fluxo de glicose mediado pela insulina.

A exploração do rebanho caprino no Nordeste do Brasil é caracterizada por baixos níveis de produção e reprodução. O manejo nutricional é dependente, sobretudo, da variação quantitativa e qualitativa da vegetação ao longo do ano. Por estas razões, é escassa a utilização das biotécnicas reprodutivas como forma de aumentar a produtividade. Para o produtor, é fundamental a disponibilidade e o custo da suplementação alimentar durante o ano, sobretudo na estação seca. Nesse sentido, é importante o desenvolvimento de um protocolo simples e eficiente de estimulação energética a fim de maximizar a resposta ovulatória e a consequente produção de embriões “in vivo” em cabras nativas.

Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar a utilização da insulina para estimulação e manutenção do nível energético, proporcionando uma melhor resposta a um tratamento padrão de superovulação.

## **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido na Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (UECE) em Fortaleza, Ceará, localizada a 3°43' S e 38°30' O. Para este estudo foram utilizadas 12 fêmeas caprinas da raça Moxotó oriundas da Embrapa Caprinos (Sobral-CE), adultas com idade média ± DP de  $3,6 \pm 0,7$  anos, pluríparas e de peso médio ± DP de  $27,5 \pm 4,0$  kg.

Os animais foram mantidos em um sistema de manejo semi-intensivo, onde pela manhã ficavam em área de exercício ao redor de um aprisco suspenso e, à tarde, eram alojados em boxes cobertos, contendo comedouros, com acesso livre à água e ao sal mineral. As cabras foram submetidas a um período pré-experimental mínimo de 15 dias, visando estabelecer uma hierarquia e a sua adaptação às condições de manejo. Os animais receberam feno de Tifton (“Cynodon dactylon”) “ad libitum” e concentrado contendo 19% de proteína bruta em quantidade a fornecer um nível nutricional correspondente a 1,5 vezes o requerimento energético e protéico de manutenção (AFRC, 1988).

Após o período pré-experimental, as cabras foram selecionadas aleatoriamente e divididas em dois grupos, um Controle ( $n = 5$ ), onde foi mantido o nível nutricional e um Insulina ( $n = 7$ ) que receberam, além da alimentação, insulina.

O estro dos animais foi sincronizado com esponjas vaginais contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon™R”, Syntex, Argentina) inserida por 11 dias, com aplicação de 50 $\mu$ g de D-Cloprostenol (Ciosin, Schering-Plough-Coopers, Brasil) por via intramuscular quarenta e oito horas antes da retirada do progestágeno e iniciado o tratamento superovulatório, que consistiu de seis aplicações de pFSH (Folltropin™R”, Vetrepharm, Canadá), em doses decrescentes, com intervalos de 12 h, perfazendo uma dose total de 120 mg (30/30, 15/15 e 15/15 mg), sendo feita a administração de insulina (0,2 UI / kg de PV / dia) nos animais do grupo correspondente, por via sub-cutânea, concomitante à primeira, terceira e quinta aplicação de pFSH. As esponjas foram removidas no momento da quinta dose de pFSH, sendo então, 12 h após, as cabras submetidas à detecção do estro em intervalos de quatro horas. Oito dias após a remoção da esponja, as cabras foram sujeitas a procedimento de laparoscopia para avaliação da resposta ovariana.

Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) onde o fator testado foi o grupo, sendo as comparações entre os números de ovulações e os números totais de folículos executadas pelo teste do Qui-quadrado e expressos com valor  $\pm$  desvio padrão. O nível de significância utilizado foi de 5%.

## **Resultados e Discussão**

No que se refere ao número de animais que exibiram comportamento de estro, o grupo Insulina apresentou resultado semelhante ao grupo Controle, 71,4% (5/7) e 60% (3/5), respectivamente. No grupo Insulina houve uma tendência a um maior percentual de animais em estro que no grupo Controle, o que pode evidenciar um efeito positivo da administração de insulina, como forma de aumentar o aporte energético durante o ciclo reprodutivo. Resultado semelhante foi encontrado por Mani *et al.* (1992), comparando caprinos alimentados com dietas de diferentes níveis nutricionais, que demonstraram que, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, animais submetidos à dieta de manutenção tendem a ter suas taxas de animais apresentando estro superiores àquelas observadas em animais sujeitos a restrição alimentar (87,5% e 71,0%, respectivamente).

Foram considerados responsivos ao tratamento aqueles animais que apresentassem pelo menos 5 corpos lúteos em ambos os ovários, sendo observado valores semelhantes entre os grupos Insulina e Controle, com 71,4% e 60%, respectivamente, o que está

semelhante aos resultados obtidos por Selvaraju *et al.* (2003) que obtiveram uma resposta média de 73,3% de animais responsivos ao tratamento superovulatório.

O número total de ovulações indicou um efeito significativo ( $P<0,05$ ) do tratamento com Insulina em relação ao grupo Controle (Figura 8,  $P<0,05$ ). Este fato também ficou evidente no número total folículos (2 a 5mm) (Tabela 1) e no número de folículos pré-ovulatórios. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Selvaraju *et al.* (2003), estudando a resposta ovariana de cabras tratadas com insulina, onde observaram que há um aumento significativo na taxa de ovulação quando administrada insulina antes início do tratamento superovulatório, o que pode resultar de uma alteração da dinâmica folicular causada pela insulina, através de um aumento do recrutamento folicular, bem como de uma diminuição do número de folículos que entram em processo de atresia.

O *status* energético pode ser considerado o principal fator que influencia os processos reprodutivos. Downing *et al.* (1995), avaliando a infusão de glicose em ovelhas, observaram um aumento na taxa de ovulação, como resultado de uma ação direta da disponibilidade da glicose, mediada pela insulina, e também um aumento das concentrações de FSH durante a fase folicular, o que reflete positivamente sobre o número de folículos recrutados. Rhind e McNeilly (1998), observaram que ovelhas submetidas a dietas de elevada ingestão tiveram um número significativamente superior de folículos de 1 mm quando comparadas a animais com dieta restrita, o que poderia ser atribuído a um aumento da resposta ovariana às gonadotrofinas circulantes, hormônios metabólicos e fatores de crescimento.

Aumentos na taxas de ovulação estão diretamente relacionados com a disponibilidade de energia (Boland *et al.*, 2001). Como ambos os grupos apresentaram resultados semelhantes em relação ao número de animais demonstrando estro e número de animais responsivos ao tratamento, os resultados superiores observados no grupo Insulina em relação ao total de ovulações pode ser atribuído à ação da insulina, como mediador da absorção de glicose, levando a um aumento na disponibilidade de energia, o que refletiu positivamente sobre o processo de ovulação.

## Conclusão

A administração de insulina mostrou-se um método eficiente de aumentar a resposta ovulatória de cabras da raça Moxotó durante um tratamento de sincronização do estro e superovulação.

Tabela 1. Número total de folículos de 2 a 5mm observados em cabras da raça Moxotó recebendo ou não insulina durante um tratamento de superovulação.

Tratamento	N*	Folículos			
		2 mm	3 mm	4 mm	5 mm
Insulina	5	38	14	5	9
Controle	3	4	13	9	3

N\*: número de animais responsivos ao tratamento superovulatório.

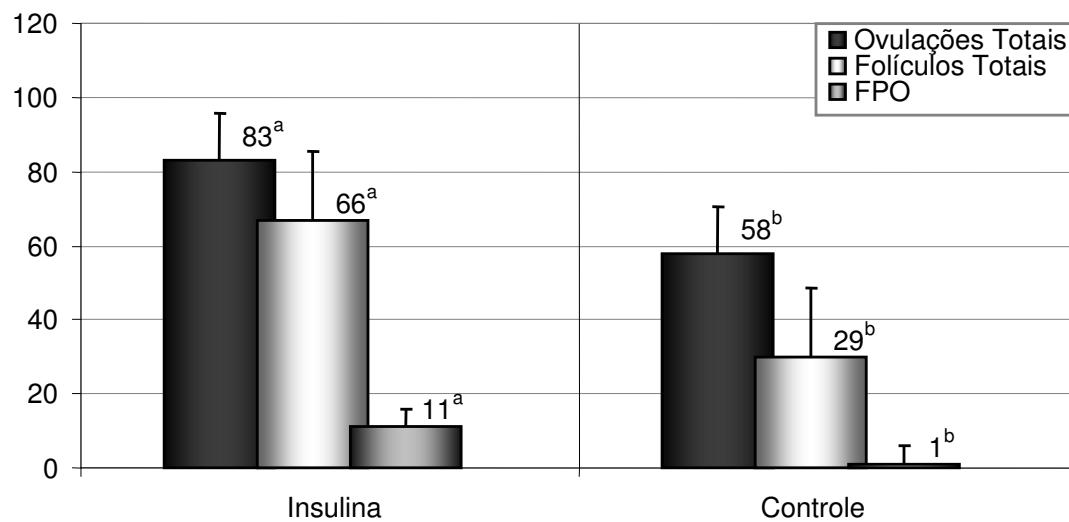


Fig. 08. Número total de ovulações, folículos totais (2 a 5 mm) e folículos pré-ovulatórios (FPO) observados em cabras da raça Moxotó recebendo ou não insulina durante um tratamento de superovulação.

<sup>a,b</sup> Sobreescritos diferentes diferem significativamente ( $P<0,05$ ).

## **REFERÊNCIAS**

- AFRC. The nutrition of goats. CAB International, 118pp, 1998.
- BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, 55, 1323-1340, 2001.
- DOWNING, J.A.; JOSS, J.; CONNELL, P.; SCARAMUZZI, R.J. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrus cycle. *Journal of Endocrinology*, 146: 403-410, 1995.
- MANI, A.U.; MCKELVEY, W.A.C.; WATSON, E.D. The effects of low leve of feeding on response to synchronization of estrous, ovulation rate and embryo loss in goats. *Theriogenology*, 38: 1013-1022, 1992.
- RHIND, S.M.; MACNEILLY, A.S. Effects of level of food intake on ovarian follicle number, size and steroidogenic capacity in the ewe. *Animal Reproducion Science*, 52: 131-138, 1998.
- SELVARAJU, S.; AGARWAL, S. K.; KARCHE, S. D.; MAJUMDAR A. C. Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats treated with insulin. *Theriogenology*, 59: 1459-1468, 2003.

## **7. CAPÍTULO 2**

### **RESPONSIVIDADE AO TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO EM CABRAS COM BALANÇO ENERGÉTICO ESTIMULADO**

*(Responsiveness to superovulation treatment in goats with stimulated energy balance)*

**Animal Reproduction Science (Submetido)**

## **Responsividade ao tratamento superovulatório em cabras com balanço energético estimulado**

Almeida, A.P.<sup>1</sup>, Souza, A.L.<sup>1</sup>, Galeati G.<sup>2</sup>, Lopes-Junior E.S.<sup>1</sup>, Govoni, N.<sup>2</sup>, Freitas V.J.F.<sup>1</sup>, Rondina D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>\* Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade de Veterinária de Bolonha, Bolonha, Itália.

\* Instituto onde o trabalho foi conduzido.

### **Resumo**

Cabras da raça Moxotó adultas foram submetidas a tratamento de sincronização/superovulação com esponjas vaginas com 60 mg de MPA por 11 dias, aplicação de 50 $\mu$ g de cloprosteno 48h antes da remoção da esponja e 120 mg de pFSH nos dias 9, 10 e 11. As cabras foram distribuídas em três grupos: Alimentação (n = 5): dieta com 150% da manutenção (1,5 x M); Propilenoglicol (n = 5): dieta com 1,5 x M e administração de 80 mL/cabra/dia de propilenoglicol durante o procedimento hormonal; Insulina (n = 7): dieta com 1,5 x M e 3 injeções de insulina (0,2 UI/KgPV/dia) nos dias 9, 10 e 11. Do momento da colocação da esponja, a cada 3 dias e a partir do início do estro, durante 24h a intervalos de 4h, amostras de sangue foram colhidas para mensurações de insulina e estradiol. A ovulação foi verificada por laparoscopia 8 dias após a remoção da esponja. As taxas de insulina tratadas com propilenoglicol foi similar ao grupo Insulina ( $P > 0,05$ ) e ambas foram superiores às cabras suplementadas ( $P < 0,05$ ). Nos grupos Insulina e Alimentação, a concentração do estro foi superior ao grupo tratado com propilenoglicol ( $P < 0,05$ ). Apesar do número de animais que ovularam ter sido similar entre os grupos, as cabras tratadas com insulina mostraram um número maior de folículos e corpos lúteos ( $P < 0,05$ ). Neste grupo, a quantidade de estradiol foi correlacionada ao número de CL ( $r = 0,84$ ,  $P < 0,05$ ). Em conclusão, o tratamento com insulina mostrou-se mais eficiente na resposta ovulatória e mais prático na utilização em campo.

Palavras-chave: Caprinos, Nutrição, Raça Nativa, Resposta ovariana, Balanço energético.

## **Introdução**

O balanço energético positivo é uma condição essencial em tecnologias de reprodução assistida quando usadas para dar suporte a programas de conservação de recursos genéticos de animais domésticos. Especialmente em áreas tropicais áridas, onde a principal desvantagem da caprinocultura é ainda manter o estado nutricional durante a prolongada estação de escassez de comida. Nessas regiões, a baixa condição corporal das fêmeas, associada ao número restrito animais nas pequenas populações nativas, sugere a maximização da resposta reprodutiva pelo aumento da disponibilidade de nutrientes para o ovário.

Em caprinos, assim como em outros ruminantes, a insulina é um reconhecido sinal para mediar mudanças da ingestão de nutrientes e a dinâmica folicular. Em cabras, após tratamento de superovulação, a resposta ovariana foi aumentada através de injeções de insulina (Selvaraju *et al.*, 2003), ou pelo aumento da ingestão da dieta em novilhas (Gong *et al.*, 2002). Hidalgo *et al.* (2004), utilizando propilenoglicol por um curto período aumentou as taxas de gestação em novilhas receptoras após transferência de embriões. A insulinemia é comumente melhorada pela administração de propilenoglicol in vacas (Miyoshi *et al.*, 2001) ou ovelhas (Chiofalo *et al.*, 2005) durante o pós-parto.

Embora várias formas de manipulação de energia tenham sido descritas na literatura, muito pouco ainda é conhecido, especialmente em caprinos, no que diz respeito a qual procedimento fornece melhor estimulação a nível de ovário. Assim, o objetivo deste estudo foi comparar a resposta ovulatória após tratamento de superovulatório em cabras com balanço energético estimulado por diferentes protocolos.

## **Material e Métodos**

### *Animais e Local do Experimento*

O experimento foi desenvolvido na Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) em Fortaleza, Ceará, localizada a 3°43' S e 38°30' O. Para este estudo, foram utilizadas 17 fêmeas caprinas da raça Moxotó, multíparas, adultas, com média  $\pm$  EMP de  $26,60 \pm 4,08$  kg e idade ( $3,29 \pm 0,69$  anos). Os animais utilizados neste estudo fazem parte de um a raça nativa que faz parte de um programa de conservação *in situ* realizado pela Embrapa Caprinos (Embrapa Caprinos – Sobral, Ceará).

### *Delineamento Experimental*

O delineamento experimental é resumido na figura 9.

As cabras foram mantidas em regime de manejo semi-intensivo. Eram mantidas em curral aberto, de 08:00 às 16:00, e após eram colocadas em abrigos cobertos no nível do solo. Todos os animais foram submetidos a 15 dias de adaptação às instalações e hierárquica e foram alimentadas com feno de Tifton (*Cynodon dactylon*) e concentrado de maneira a fornecer 150% dos requerimentos energéticos de manutenção do peso corporal (1,5 x M; ARFC, 1998).

As cabras tiveram livre acesso à água e sal mineral. Todas as fêmeas foram submetidas à sincronização do estro através de esponjas vaginais impregnadas com 60 mg de MAP (Progespon®, Syntex, Argentina) por 11 dias e 50 µg de cloprostenol (Ciosin®, Coopers, Brazil), 48 h antes da remoção da esponja. Durante os dias 9 a 11, as cabras foram superovuladas utilizando 120 mg de pFSH (Folltropin®, Vetrepharm, Canada) administrada por via intra muscular em intervalos de 12 h em doses decrescentes (30/30, 15/15 e 15/15 mg). As esponjas foram removidas no momento da quinta dose de pFSH.

Os animais foram distribuídos em três tratamentos energéticos. Grupo Alimentação (n = 5): dieta com 1,5 x M; Propilenoglicol (n = 5): dieta com 1,5 x M e administração de 80 mL/cabra/dia de propilenoglicol durante o tratamento hormonal e; Insulina (n = 7): dieta com 1,5 x M e 3 injeções de insulina (0,2UI/KgPV/dia) nos dias 9, 10 e 11, no momento das aplicações de pFSH. A resposta ovariana foi verificada através de laparoscopia, que foi realizada 8 dias após a remoção da esponja. Cabras demonstrando 5 ou mais corpos lúteos (CL) foram considerados responsivos ao tratamento superovulatório.

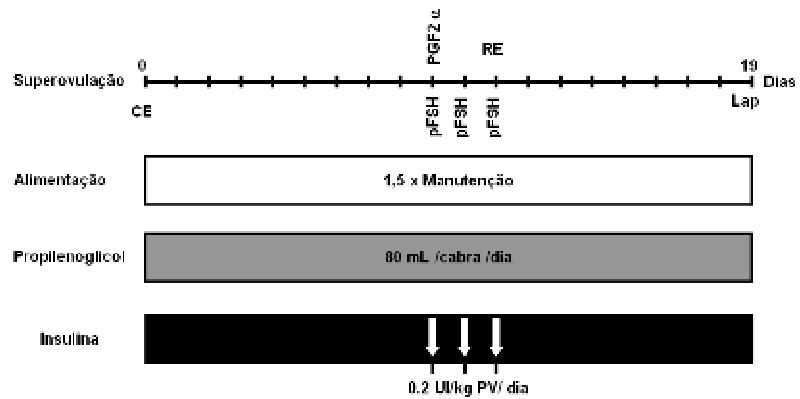


Fig. 9. Delineamento experimental. Tratamento de sincronização e superovulação: dia 0, colocação da esponja (CE) e início dos tratamentos nutricionais, dia 9, administração de PGF<sub>2α</sub>, dias 9-11, tratamento de FSH (pFSH), dia 11, remoção da esponja (RE). Após os 8 dias seguintes, dia 18, laparoscopia (Lap). Alimentação: dieta com 1,5 x requerimentos energéticos de manutenção; Propilenoglicol: dieta com 1,5 x M e administração de 80 mL/dia/cabra durante o tratamento hormonal; Insulina: dieta com 1,5 x M e três injeções de insulina (0,2 UI/kgPV/dia) nos dias 9, 10 e 11, em correspondência ao tratamento com FSH.

#### Dosagens Hormonais

Da inserção da esponja, a cada 3 dias até a véspera da laparoscopia e a partir do início do estro, durante 24 h, em intervalos de 4 h antes da alimentação, amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados por venopunção. No plasma, 17β-estradiol foi mensurado como descrito por Tamanini *et al.* (1985) e a insulina foi determinada utilizando um kit RIA (Insulin: Medical Systems, Genova).

#### Análise Estatística

O efeito dos protocolos energéticos (Alimentação, Propilenoglicol, Insulina) foi analisado pelo procedimento GLM do SAS (SAS, Inc., USA). Comparações entre médias dos tratamentos nutricionais foi realizado através do test de Duncan. Diferenças entre proporções ou números foram analisada através do Qui Quadrado. Teste de correlação foi realizado através do test do Spearman. Valores foram expressos em média ± EMP.

## **Resultados**

Durante o período experimental, as concentrações de insulina (Tabela 2) no grupo Alimentação demonstrou valores significativamente menores ( $P < 0,05$ ) quando comparado com os outros tratamentos energéticos. Resultado similar foi encontrado em cabras ovulando quando os níveis de insulina foi mensurado durante as 24 h após o início do estro (Figura 11). Neste intervalo, a média dos níveis de insulina nas cabras tratadas com propilenoglicol ( $13,12 \pm 0,49 \mu\text{U/mL}$ ) foi similar ao grupo Insulina ( $14,61 \pm 0,48 \mu\text{U/mL}$ ) ( $P > 0,05$ ), e ambos foram superiores ao das cabras suplementadas ( $9,68 \pm 0,43 \mu\text{U/mL}$ ) ( $P < 0,05$ ).

Duas cabras de cada grupo não exibiram estro e ovulação após tratamento de sincronização/ superovulação, exceto no grupo Alimentação, onde apenas um animal dos dois apresentou um único CL (Tabela 2).

O intervalo entre a remoção da esponja e início do estro (Tabela 2) não teve diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,05$ ) demonstraram uma média de  $29,45 \pm 2,11$  horas. Diferentemente, no grupo propilenoglicol, o intervalo entre a ocorrência do primeiro e do último estro foi maior que no grupo tratado com insulina ( $P < 0,05$ ) (Tabela 2). No grupo Propilenoglicol, o estro foi distribuído de 20 a 40 horas após remoção da esponja (Figura 10).

O padrão de estradiol mensurado nas 72 h após o estro foi dado na figura 11. Nenhuma diferença foi encontrada entre os tratamentos no que diz respeito ao número de animais ovulando e para as cabras apresentando mais que 5 CL (Tabela 2). À laparoscopia, no grupo Insulina foi contado um maior número de folículos e CL ( $P < 0,05$ ). Neste tratamento, a quantidade de estradiol foi correlacionada com o número de corpos lúteos ( $r = 0,84$ ,  $P < 0,05$ ). A taxa de ovulação foi  $13,06 \pm 1,67$ ,  $16,60 \pm 1,96$  e  $19,30 \pm 1,15$ , respectivamente para os grupos Propilenoglicol, Insulina e Alimentação.

Tabela 2. Resposta estral, ovariana e hormonal em cabras com diferentes protocolos energéticos. Valores expressos em media  $\pm$  EMP.

Parâmetros		Insulina	Propilenoglicol	Alimentação
Animais tratados	N	7	5	5
Responsividade estral				
Animais exibindo estro	%	71 % (5/7)	60 % (3/5)	60 % (3/5)
RE-IE	H	31,20 $\pm$ 1,50 <sup>a</sup>	32,00 $\pm$ 6,11 <sup>a</sup>	24,00 $\pm$ 4,00 <sup>a</sup>
Intervalo de ocorrência do estro <sup>1</sup>	H	8 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	12 <sup>ab</sup>
Resposta ovariana				
Total de folículos 2 – 5 mm <sup>2</sup>	N	70 (7/7) <sup>a</sup>	24 (3/5) <sup>b</sup>	29 (4/5) <sup>b</sup>
Folículos pré-ovulatórios <sup>2</sup>	N	10 (4/7) <sup>a</sup>	5 (2/5) <sup>ab</sup>	1 (1/5) <sup>a</sup>
Animais ovulando	%	71 % (5/7) <sup>a</sup>	60 % (3/5) <sup>a</sup>	80 % (4/5) <sup>a</sup>
Animais com > 5 CL <sup>3</sup>	%	100 % (5/5)	100 % (3/3)	75 % (3/4)
Total de CL <sup>2</sup>	N	83 <sup>a</sup>	41 <sup>b</sup>	58 <sup>b</sup>
CL em regressão <sup>2</sup>		14 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
Resposta hormonal <sup>d</sup>				
Insulina	$\mu$ U/mL	171.65 $\pm$ 9.40 <sup>a</sup>	156.85 $\pm$ 6.17 <sup>a</sup>	122.38 $\pm$ 4.04 <sup>b</sup>
Estradiol	pg/mL	228.36 $\pm$ 55.88	222.54 $\pm$ 93.49	232.61 $\pm$ 78.06

<sup>1</sup> Intervalo (h) entre primeira e última ocorrência de estro; <sup>2</sup> numero total; <sup>3</sup> CL = corpo lúteo; <sup>4</sup> variação media total; <sup>a,b,c</sup> P < 0.05.

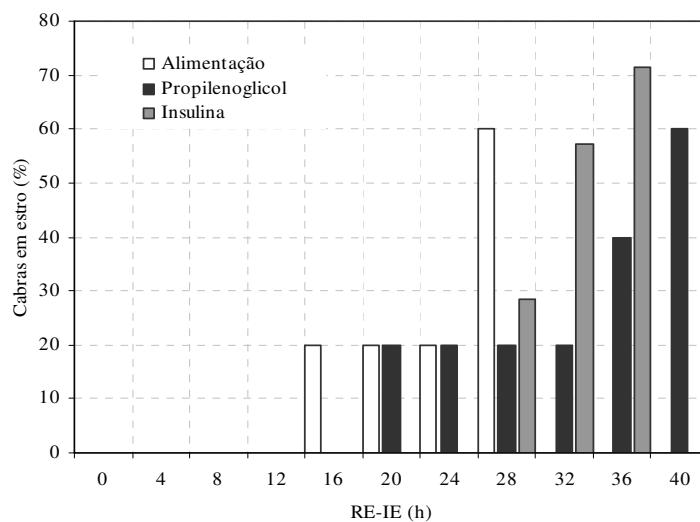


Fig. 10. Distribuição cumulativa de cabras em estro de acordo com o intervalo (h) entre a remoção da esponja (RE) e o início do estro (IE).

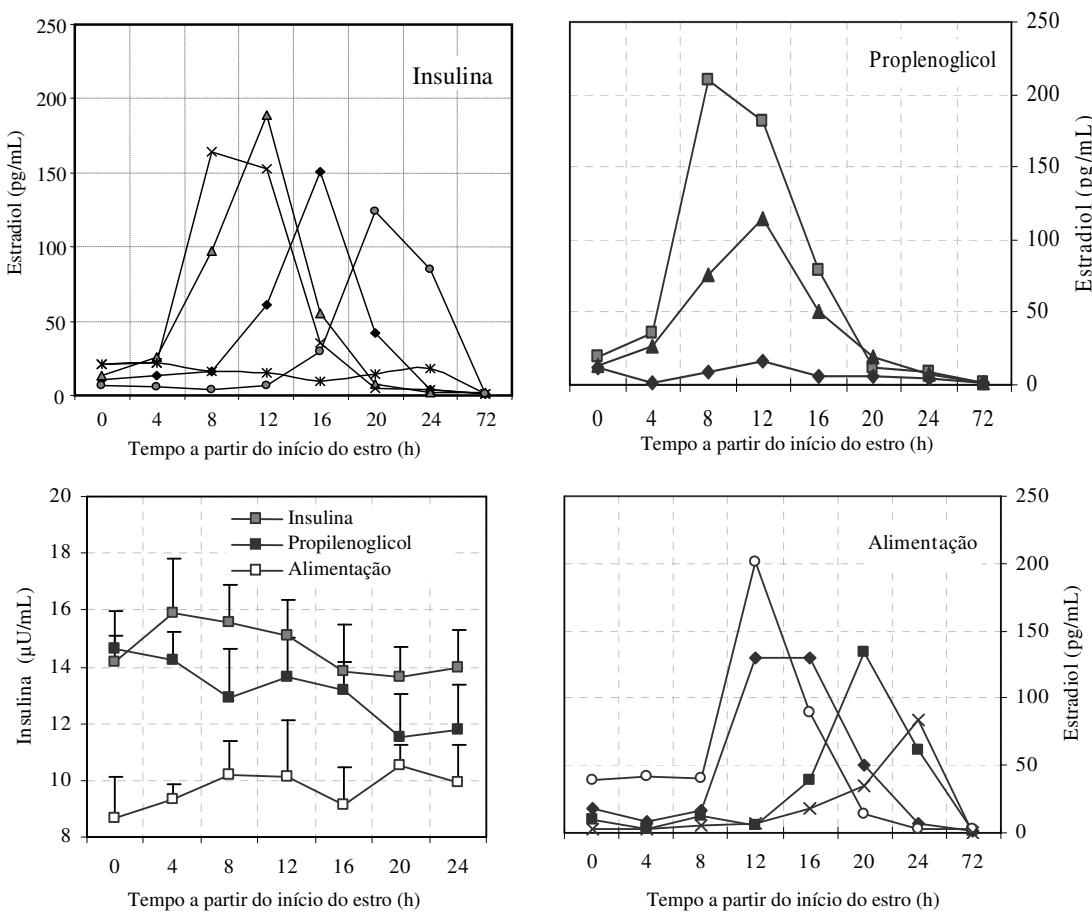


Fig. 11. Níveis de Estradiol e Insulina de acordo com o momento do início do estro em cabras ovulando com diferentes protocolos energéticos. Na figura, os valores da insulina e estradiol são expressos em media  $\pm$  EMP.

## Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que é possível estimular no curto prazo o balanço energético, induzindo uma resposta significativa ao tratamento superovulatório em cabras para os três grupos experimentais.

A resposta reprodutiva nos ruminantes está diretamente relacionada com a disponibilidade de energia ovariana, a qual por sua vez está relacionada ao controle dos processos anabólicos e catabólicos controlados pela insulina (Monget e Martins, 1997). Variações das concentrações periféricas de insulina em curtos intervalos de tempo podem ser alcançadas mediante infusões de insulina (Downing e Scaramuzzi, 1997), ou através da absorção ruminal de propionato mediante aumento do consumo alimentar (Gong *et al.*, 2002) ou a administração de precursores como o propilenoglicol (Sauer *et al.*, 1973).

No presente experimento, apesar das diferenças na taxa de insulina plasmática observada entre estes três tipos de tratamentos energéticos, os perfis registrados ao longo do experimento apresentaram sempre valores de acordo com aqueles propostos por outros autores utilizando cabras bem alimentadas (Khan e Ludri, 2002; Rondina *et al.*, 2005).

Com relação aos parâmetros reprodutivos os dados mostraram que a insulinemia não agiu sobre o número de animais em estro, intervalo entre a retirada da esponja e o início do estro, qualquer que seja o grupo estudado. Este resultado foi esperado devido o nível alimentar mantido ao longo do experimento. Em ruminantes, diferentes autores já comprovaram que pode ser obtida uma resposta superior de estro em consequência a uma melhoria da condição corporal (Lassoued *et al.*, 2004; Paula *et al.*, 2005). No entanto, levando em consideração os animais com insulinemia semelhante (grupos Propilenoglicol e Insulina) verificou-se uma diferença no que se refere à freqüência e distribuição do aparecimento do estro. A distribuição mais concentrada de cabras em estro no grupo Insulina pode ser devido a um efeito relacionado ao momento de aplicação da mesma, ou seja, em um período curto e próximo ao estro, resultando em uma resposta mais imediata ao estímulo.

A taxa de ovulação observada no experimento foi semelhante ao observado em cabras superovuladas com eCG ou FSH (Armstrong *et al.*, 1982; Pendleton *et al.*, 1992). A resposta ao tratamento superovulatório ( $\geq 5$  CL/animal) foi observada nos três grupos experimentais, não havendo diferenças entre grupos. Estes valores estão semelhantes aos obtidos por Selvaraju *et al.* (2003) que obtiveram uma resposta média de 73.3% de cabras mestiças tratadas com insulina responsivas ao tratamento superovulatório.

A melhor resposta ovariana total (folículo e CL) no grupo Insulina não pode ser explicada por efeitos ligados à insulinemia, outrossim a um possível efeito sinérgico entre a mesma e a estimulação hormonal produzida pelo tratamento superovulatório simultâneo ao recrutamento folicular durante a onda folicular. Selvaraju *et al.*, (2003) observaram um incremento no número de folículos e ovulações, atribuindo este resultado a uma diminuição do número de folículos que entram em processo de atresia.

O status energético pode ser considerado o principal fator que influencia os processos reprodutivos. Downing *et al.* (1995), avaliando a infusão de glicose em ovelhas, observaram um aumento na taxa de ovulação, como resultado de uma ação direta da disponibilidade da glicose, mediada pela insulina, e também um aumento das concentrações de FSH durante a fase folicular, o que pode causar um aumento no número de folículos recrutados. Rhind e McNeilly (1998) observaram que ovelhas submetidas a dietas de elevada ingestão tiveram um número significativamente superior de folículos de 1

mm quando comparadas a animais com dieta restrita, o que poderia ser atribuído a um aumento da resposta ovariana às gonadotrofinas circulantes, hormônios metabólicos e fatores de crescimento.

A variabilidade da resposta ovulatória de doadoras após tratamento gonadotrópico existe em pequenos ruminantes, ela é mais importante na ovelha do que na cabra. Após tratamento com FSH para indução da superovulação, quase 25% das ovelhas leiteiras da raça Lacaune apresentam menos de cinco ovulações contra somente 10% nas cabras das raças Alpina e Saanen (Baril *et al.*, 1989). Portanto, esta variabilidade já é esperada em pequenos ruminantes. Em adição, a impregnação com progestágeno tem sido identificada como causa desta variação devido a fatores sistêmicos, como o perfil de LH, ou a nível ovariano, perfil de crescimento folicular e dominância (Leyva *et al.*, 1998).

A raça tem sido também identificada como um fator que pode contribuir para a variabilidade da resposta ovulatória (Bindon *et al.*, 1986). Em geral, raças ovinas prolíficas apresentam melhores respostas ovulatórias ao estímulo gonadotrófico exógeno (Dufour *et al.*, 2000). Porém, em caprinos, a prolificidade natural da raça parece não ser um fator determinante para esta resposta (Kiessling *et al.*, 1986).

Baldassarre *et al.*, 2004, em um trabalho com cabras de pequeno porte da raça BELE®, adotou a dose total de 133 mg de pFSH, obtendo uma resposta taxa de ovulação de 12,4 a 12,9 ovulações por doadora.

## Conclusão

Os resultados mostraram como a injeção de insulina no momento do tratamento superovulatorio realizou uma maior efeito sinérgico no ovário, levando a um aumento na disponibilidade de energia, o que refletiu positivamente sobre a sincronia da expressão dos estros, o recrutamento folicular e o processo de ovulação.

Além disso, a utilização da insulina como estratégia para estimular o balanço energético mostrou-se um método mais prático e econômico em relação ao propilenoglicol, uma vez que o segundo demanda aplicações diárias, enquanto o primeiro restringe a aplicação da técnica a um intervalo limitado de tempo interferindo de forma menor no sistema de manejo dos animais.

## Agradecimentos

A.P. Almeida e A.L. Souza receberam bolsas de estudo CAPES/Brasil. Os autores gostariam de agradecer à Embrapa Caprinos pela cessão dos animais usados neste estudo. O trabalho foi financiado pela FUNDECI-BNB (Brasil). V.J.F. Freitas é pesquisador sênior do CNPq/Brasil.

## REFERÊNCIAS

- AFRC. The nutrition of goats. CAB International, 118pp, 1998.
- ARMSTRONG, D.T.; FITZNER, A.P.; SEAMARK, R.F. Ovarian responses and embryo survival in goats following superovulation and embryo transfer. *Theriogenology*, v.17, n.1, p.76, 1982.
- BALDASSARRE, H.; WANG, B.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Effect of GnRH injection timing in the production of pronuclear-stage zygotes used for DNA microinjection. *Zygote* v.12, p.257-261, 2004.
- BARIL, G.; CASAMITJANA, P.; PERRIN, J.; VALLET, J.C. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *Zuchthyg.*, v. 24, p. 101-115, 1989.
- BINDON, B.M.; PIPER, L.R.; CAHILL, L.P.; DRIANCOURT, M.A.; O'SHEA, T. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology*, v.25, p.53-70, 1986.
- CHIOFALO, V.; TODARO, M. ; LIOTTA, L. ; MARGIOTTA, S.; T. MANZO, G. Effect of Propylene Glycol on Pre- and Postpartum Performance by Dairy Ewes. *Small Ruminant Research* v.58, p.107-114, 2005.
- DOWNING, J. A.; SCARAMUZZI, R. J. The effect of infusion of insulin during the luteal phase of the estrous cycle on the ovulation rate and on plasma concentrations of LH, FHS and glucose in ewes. *Theriogenology*, v.47, p.747-759, 1997.
- DOWNING, J.A.; JOSS, J.; CONNELL, P.; SCARAMUZZI, R.J. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrus cycle. *Journal of Endocrinology*, v.146, P.403-410, 1995.
- DUFOUR, J.J.; COGNIÉ, Y; MERMILLOD, P.; MARIANA, J-C.; ROMAIN R.F. Effects of the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.118, p.85-94, 2000.
- GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G.; BAXTER, G.; HOGG, C.O.; GARNSWORTHY,

- P.C.; WEBB, R. The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology* v.57, p.1591–1602, 2002.
- HIDALGO, C.O.; GÓMEZ, E.; PRIETO, L.; DUQUE, P.; GOYACHE, F.; FERNÁNDEZ, L.; FERNÁNDEZ, I.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Pregnancy rates and metabolic profiles in cattle treated with propylene glycol prior to embryo transfer. *Theriogenology*, v.62, p.664–676, 2004.
- KHAN, J.R.; LUDRI, R.S. Hormone profile od crossbred goats during the periparturient period. *Tropical Animal Health and Production*, v.34, p.151-162, 2002.
- KIESSLING, A.A.; HUGHES, W.H.; BLANKEVOORT, M.R. Superovulation and embryo transfer in the dairy goat. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 188 p.829-832, 1986.
- LASSOUED, N.; REKIK, M.; MAHOUACHI, M.; BEN HAMOUDA, M. The effect of nutrition prior to and during mating on ovulation rate, reproductive wastage, and lambing rate in three sheep breeds. *Small Ruminant Research* v.52, p.117–125, 2004.
- LEYVA, V.; BUCKRELL, B.C.; WALTON, J.S. Follicular activity and ovulation regulated by exogenous progestagen and PMSG in anestrous ewes. *Theriogenology*, 50: 377-393, 1998.
- MIYOSHI, S.; PATE, J.L.; PALMQUIST, D.L. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v.68, n.2, p.29-43, 2001.
- MONGET, P.; MARTIN, G.B. Involvement of insulin-like growth factor in the interations between nutrition and reproduction in female mammals. *Human Reproduction*, v.12, p.33-52, 1997.
- PAULA, N.R.O; GALEATI, G.; TEIXEIRA, D.I.A; LOPES JÚNIOR, E.S.; FREITAS, V.J.F.; RONDINA, D. Responsiviness to progestagen-eCG-cloprostenol treatment in goat food restricted for long period and refed. *Reproduction in Domestic Animals*, v.40, p.1-3, 2005.
- PENDLETON, R.J.; YOUNGS, C.R.; RORIE, R.W.; POOL, S.H.; MEMON, M.A.; GODKE, R.A. Comparison of fluorogestone acetate sponges with norgestomet implants for induction of estrus and ovulation in anestrous dairy goats. *Small Ruminant Research* v.8, p.269-273, 1992.
- RHIND, S.M.; MACNEILLY, A.S. Effects of level of food intake on ovarian follicle number, size and steroidogenic capacity in the ewe. *Animal Reproducion Science*, v.52, p.131-138, 1998.
- RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F.; SPINACI, M .; GALEATI, G. Effect of Nutrition on

Plasma Progesterone Levels, Metabolic Parameters and Small Follicles Development in Unstimulated Goats Reared Under Constant Photoperiod Regimen. Reproduction in Domestic Animals, v.40, p.548-552, 2005.

SAUER, F.D.; ERFLE, J.D.; FISHER, L.J. Propylene glycol and glycerol as a feed additive for lactating dairy cows: an evaluation of blood metabolite parameters. Canadian Journal of Animal Science v.53, p.265–271, 1973.

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

TAMANINI, C.; BONO, G.; CAIROLI, F.; CHIESA, F. Endocrine responses induced in anestrous goats by the administration of different hormones after a fluorogestone acetate treatment. Animal Reproduction Science, v.9, p.357-364, 1985.

## **8. CONCLUSÃO GERAL**

Cabras submetidas à ingestão de insulina no momento do tratamento superovulatório tiveram um maior aumento na disponibilidade de energia, o que refletiu positivamente sobre a sincronia da expressão dos estros, o recrutamento folicular e o processo de ovulação.

De acordo com o observados nos experimentos, a utilização da insulina como estratégia para estimular o balanço energético mostrou-se um método mais prático e econômico em relação ao propilenoglicol, uma vez que o segundo demanda aplicações diárias, enquanto o primeiro restringe a aplicação da técnica a um intervalo limitado de tempo interferindo de forma menor no sistema de manejo dos animais.

## **9. PERSPECTIVAS**

Os resultados deste estudo fornecem informações para a melhoria do manejo nutricional em cabras exploradas no Nordeste do Brasil. No entanto, tornam-se necessários estudos referentes à utilização, tanto da insulina, como do propilenoglicol, em outras formas e em vários estágios dentro do processo produtivo que busquem maximizar a resposta reprodutiva dos animais tratados.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, B.; TARNAVSKY, G.K.; PLATT, T.E.; HAMERNIK, D.L.; BROWN, J.L.; SCHOENEMANN, H.M.; REEVES, J.J. Nursing enhances the negative effect of estrogen on LH release in the cow. *Journal of Animal Science*, v.57, p.1530–1536, 1983.
- ADAM, C.L. Nutrition and the implications of modifying the seasonality of farmed red deer. In: Haresign, W., Cole, D.J.A. (Eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*. Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, UK, p.211–223, 1991.
- ADAM, C.L.; FINDLAY, P.A.; KYLE, C.E.; YOUNG, P. Effect of restricted nutrition on timing of puberty in female Soay sheep. *Journal of Reproduction and Fertility* v.112, p.31–37, 1998.
- ADAM, CL; ROBINSON, J.J. The role of nutrition and photoperiod in the timing of puberty. *Procedures of Nutrition Society*, v.53, p.89-102, 1994.
- ADAMIAK, S.J.; MACKIE, K.; POWELL, K.A.; WATT, R.G.; DOLMAN, D.F.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Body composition and dietary energy intake affect folliculogenesis, oocyte quality and early embryo development. *Reproduction Abstract Series* v.30, p.62–63, 2003.
- ADAMS, G.P. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *Journal of Reproduction nad Fertility Supplement* v.54, p.17–32, 1999.
- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; GINTHER, O.J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.95, p.627–640, 1992.
- ADASHI, E.Y.; RESNICK, C.E.; ROSENFIELD, R.G. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II hormonal action in cultured granulosa cells: mediation via I but not II IGF receptors. *Endocrinology* v.126, p.754–760, 1990
- AFRC. The nutrition of goats. CAB International, 118pp, 1998.
- ALEJANDRO, B.; PEREZ, R.; PEDRANA, G.; MILTON, J.T.; LOPEZ, A.; BLACKBERRY, M.A.; DUNCOMBE, G.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; MARTIN, G.B. Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reproduction, Fertility and Development* Vz.14, p.333–337, 2002.
- AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R.; WILLIAMS, S.W.; STANKO, R.L.; NIZIELSKI, S.E.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H.; WILLIAMS, G.L. Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in pre-pubertal heifers: relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor I (Part 1). *Biology of Reproduction* v.63, p.127–133, 2000.

- ARMSTRONG, D.G.; BAXTER, G.; GUTIERREZ, C.G.; HOGG, C.O.; GLAZYRIN, A.L.; CAMPBELL, B.K.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Insulinlike growth factor binding protein-2 and -4 mRNA expression in bovine ovarian follicles: Effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology* v.139, p.2146–2154, 1998.
- ARMSTRONG, D.G.; BAXTER, G.; HOGG, C.O.; WOAD, K.J. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reproduction* v.123, p.789–797, 2002a.
- ARMSTRONG, D.G.; GONG, J.G.; GARDNER, J.O.; BAXTER, G.; HOGG, C.O.; WEBB, R. 2002b. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction* v.123, p.371–378, 2002b.
- ARMSTRONG, D.G.; GONG, J.G.; WEBB, R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: Physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reproduction Supplement*. v.61, p.403–414, 2003.
- ARMSTRONG, D.G.; GUTIERREZ, C.G.; BAXTER, G.; GLAZYRIN, A.L.; MANN, G.E.; WOAD, K.J.; HOGG, C.O.; WEBB, R. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *Jounal of Endocrinology* v.165, p.101–113, 2000.
- ARMSTRONG, D.G.; MCEVOY, T.G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J.J.; HOGG, C.O.; WOAD, K.J.; WEBB, R. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biology of Reproduction* v.64, p.1624–1632, 2001.
- ARMSTRONG, D.G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: The role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reviews of Reproduction*, v.2, p.139–146, 1997.
- ARMSTRONG, J.D.; BENOIT, A.M. Paracrine, autocrine, andendocrine factors that mediate the influence of nutrition on reproduction in cattle and swine: an *in vivo* IGF-I perspective. *Journal of Animal Science*, v.74 (Supplement 3), p.18–35, 1996.
- AUSTIN, E. J.; MIHM, M.; EVANS, A.C.O.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.L.H.; IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction* v.64, p.839–848, 2001
- BALDASSARRE, H.; WANG, B.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Effect of GnRH injection timing in the production of pronuclear-stage zygotes used for DNA microinjection. *Zygote* v.12, p.257–261, 2004.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzymes and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *Journal of*

Animal Science v.76, p.1903–1921, 1998.

- BARIL, G.; CASAMITJANA, P.; PERRIN, J.; VALLET, J.C. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *Zuchthyg.*, v. 24, p. 101-115, 1989.
- BASSETT N.S.; OLIVER, M.H.; BREIER, B.H.; GLUCKMAN, P.D. The effect of maternal starvation on plasma insulin-like growth factor I concentrations in the late gestation ovine fetus *Pediatric Research* v.27 p.401–404, 1990.
- BEAM, S.W.; BUTLER, W.R. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in post-partum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* V.54, p.411–424, 1999.
- BEAM, S.W.; BUTLER, W.R., 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biology of Reproduction* v.56, p.133–142, 1997.
- BEG, M. A.; MEIRA, C.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Role of oestradiol in growth of follicles and follicle deviation in heifers. *Reproduction* v.125, p.847–854, 2003.
- BERGFELD, E.G.M.; KOJIMA, F.N.; CUPP, A.S.; WEHRMAN, M.E.; PETERS, K.E.; GARCIA-WINDER, M.; KINDER, J.E. Ovarian follicle development in prepubertal heifers is influenced by the level of dietary energy intake. *Biology of Reproduction* v.51, p.1051–1057, 1994.
- BERGFELD, E.G.M.; KOJIMA, F.N.; CUPP, A.S.; WEHRMAN, M.E.; PETERS, K.E.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; KINDER, J.E. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 $\beta$ -estradiol in bovine females. *Biology of Reproduction* v.54, p.546–553, 1996.
- BETTERIDGE, K.J.; FLECHON, J-E. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology*, v.29, p.155-187, 1988.
- BINDON, B.M.; PIPER, L.R.; CAHILL, L.P.; DRIANCOURT, M.A.; O'SHEA, T. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology*, v.25, p.53-70, 1986.
- BLACHE, D.; TELLAM, R.L.; CHAGAS, L.M.; BLACKBERRY, M.A.; VERCOE, P.E.; MARTIN, G.B. Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. *Journal of Endocrinology* v.165, p.625–637, 2000.
- BLEACH, E.C.L.; GLENROSS, R.G.; FEIST, S.A.; GROOME, N.P.; KNIGHT, P.G. Plasma inhibin A in heifers: Relationship with follicle dynamics, gonadotropins and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biology of*

- BLOCK, S.S.; BUTLER, W.R.; EHRHARDT, R.A.; BELL, A.W.; VAN AMBURGH, M.E.; BOISCLAIR, Y.R. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *Journal of Endocrinology* v.171, p.339–348, 2001.
- BOLAND, M. P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* v.55, p.1323–1340, 2001.
- BORWICK, S.C.; RAE, M.T.; BROOKS, A.N.; MCNEILLY, A.S.; RACEY, P.A.; RHIND, S.M. Undernutrition of ewe lambs in utero and in early post-natal life does not affect hypothalamic–pituitary function in adulthood. *Animal Reproduction Science* v.77, p.61–70, 2003
- BORWICK, S.C.; RHIND, S.M.; MCMILLEN, S.R.; RACEY, P.A. Effect of undernutrition of ewes from the time of mating on fetal ovarian development in mid-gestation *Reproduction, Fertility and Development* v.9, p.711–715, 1997.
- BOSSIS, I.; WELTY, S.D.; WETTEMANN, R.P.; VIZCARRA, J.A.; SPICER, L.J.; DISKIN, M.G. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *Journal of Animal Science* v.77, p.1536–1546, 1999.
- BOSSIS, I.; WETTEMANN, R.P.; WELTY, S.D.; VIZCARRA, J.; SPICER, L.J. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function during realimentation and resumptions of ovulation. *Biology of Reproduction* v.62, p.1436–1444, 2000.
- BUCHOLTZ, D.C.; VIDMANS, N.M.; HERBOSA, C.G.; SCHILLO, K.K.; FOSTER, D.L. Metabolic interfaces between growth and reproduction. Part V: Pulsatile luteinising hormone secretion is dependent on glucose availability. *Endocrinology* v.137, p.601–607, 1996.
- BUTLER, W.R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Production Science* v.60–61, p.49–459, 2000.
- Campbell, B. K., E. E. Telfer, R. Webb, and D. T. Baird. 2000. Ovarian autografts in sheep as a model for studying folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* v. 163, p.137–139, 2000.
- CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D.T. Inhibin A is a follicle stimulating hormone-responsive

- marker of granulosa cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep. *Journal of Endocrinology* v.169, p.333–345, 2001.
- CAMPBELL, B. K.; SOUZA, C.; GONG, J.G.; WEBB, R.; KENDALL, N.; MARSTERS, P.; ROBINSON, G.; MITCHELL A.; TELFER, E.E.; BAIRD, D.T. Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reproduction in Domestic Ruminants V. Reproduction Supplement* v.6, p.429–443, 2003.
- CAMPBELL, B.K.; SCARAMUZZI, R.J.; WEBB, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *Reproduction in Domestic Ruminants III. Journal of Reproduction and Fertility Supplement* v.49, p.335–350, 1995.
- CANFIELD, R.W.; BUTLER,W.R. Energy balance and pulsatile luteinising hormone secretion in early post-partum dairy cows. *Domestic Animals Endocrinology* v.7, p.323–333, 1990.
- CARATY, A.; EVANS, N.P.; FABRE-NYS, C.J.; KARSCH, F.J. The pre-ovulatory gonadotrophin-releasing hormone surge: a neuroendocrine signal for ovulation. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* v.49, p.245–255, 1995.
- CHANG, C.F.; REEVES, J.J. Post-partum interval in beef cows shortened by enclomiphene. *Journal of Animal Science* v.65, p.217–223, 1987.
- CHASE JR., C.C.; KIRBY, C.J.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; LUCY, M.C. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. *Journal of Animal Science* v.76, p.212–219, 1988.
- CHELIKANI, P.K.; AMBROSE, J.D.; KENNELLY, J.J. Effect of dietary energy and protein density on body composition, attainment of puberty, and ovarian follicular dynamics in dairy heifers. *Theriogenology* v.60, p.707–725, 2003.
- CHIOFALO, V.; TODARO, M. ; LIOTTA, L. ; MARGIOTTA, S.; T. MANZO, G. Effect of Propylene Glycol on Pre- and Postpartum Performance by Dairy Ewes. *Small Ruminant Research* v.58, p.107-114, 2005.
- CLARKE, I.J.; HENRY, B.A. Leptin and reproduction. *Reviews of Reproduction* v.4, p.48–55, 1999.
- CLEMMONS, D. R.; UNDERWOOD, L.E. Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. *Annual Review of Nutrition* v.11, p.393–404, 1991.
- COSGROVE J. R.; CHARLTON S. T.; COSGROVE S. J.; ZAK L. J.; FOXCROFT G.R. Interactions between nutrition and reproduction in the pig. *Reproduction in Domestic Animals*, v.30, p.193-200, 1995.

- CROWE, M.A.; KELLY, P.; DRAIN COURT, M.A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Effects of follicle-stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth, and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin-releasing hormone-immunised heifers. *Biology of Reproduction* v.64, p.368–374, 2001.
- CURRIE, W.D.; BAUER, M.; RAWLINGS, N.C. The effect of naloxone on LHRH secretion from the median eminence of anoestrous ewes. *Animal Reproduction Science* v.31, p.113–122, 1993.
- DA SILVA, P.; AITKEN, R.P.; RHIND, S.M.; RACEY, P.A.; WALLACE, J.M. Effect of maternal overnutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and gonadal morphology in female and male foetal sheep at day 103 of gestation. *Placenta* v.24, p.248–257, 2003.
- DA SILVA, P.; AITKEN, R.P.; RHIND, S.M.; RACEY, P.A.; WALLACE, J.M. Influence of placentally mediated fetal growth restriction on the onset of puberty in male and female lambs. *Reproduction* v.122, p.375–383, 2001
- DAY, M.L.; ANDERSON, L.H. Current concepts on the control of puberty in cattle. *Journal of Animal Science* v.76 (Supplement 3), p.1–15, 1998.
- DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; GARCIA-WINDER, M.; ZALESKY, D.D.; SCHANBACHER, B.D.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Influence of prepubertal ovariectomy and oestradiol replacement therapy on secretion of luteinising hormone before and after pubertal age in heifers. *Domestic Animals Endocrinology* v.3, p.17–25, 1986.
- DAY, M.L.; WOLFE, P.L.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: role of hypothalamic–pituitary oestradiol receptors in the negative feedback of oestradiol on luteinising hormone secretion. *Biology of Reproduction* v.37, p.1054–1065, 1987.
- DE SOUSA, P.A.; BETTS, D. H.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M.; OVERSTROM, E. W.; WATSON, A. J. Localization of Na/K-ATPase  $\alpha$ -subunits and comparision of  $\alpha$ -subunit transcript levels in single cultured and in vivo bovine blastocysts. *Theriogenology* v.47, p.316 (abstract), 1997.
- DELAVAUD, C. A.; FERLAY, F.; FAULCONNIER, Y.; BOCQUIER, F.; KANN, G.; CHILLIARD, Y.Y. Plasma leptin concentrations in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *Journal of Animal Science* v.80, p.1317–1328, 2002.
- DISKIN, M.G.; MACKEY, D.R.; ROCHE, J.F.; SREENAN, J.M. Effect of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.345-370, 2003.

- DOWNING, J. A.; SCARAMUZZI, R. J. The effect of infusion of insulin during the luteal phase of the estrous cycle on the ovulation rate and on plasma concentrations of LH, FHS and glucose in ewes. *Theriogenology*, v.47, p.747-759, 1997.
- DOWNING, J.A.; JOSS, J.; CONNELL, P.; SCARAMUZZI, R.J. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrus cycle. *Journal of Endocrinology*, v.146, P.403-410, 1995.
- DOWNING, J.A.; JOSS, J.; CONNELL, P.; SCARAMUZZI, R.J. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrus cycle. *Journal of Endocrinology*, v.146, P.403-410, 1995.
- DUFOUR, J.J.; COGNIÉ, Y; MERMILLOD, P.; MARIANA, J-C.; ROMAIN R.F. Effects of the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.118, p.85–94, 2000.
- DUNN, T.G.; KALTENBACH, C.C. Nutrition and the post-partum interval of the ewe, sow and cow. Part XIV: Biennial symposium on animal reproduction. *Journal of Animal Science* v.51 (Supplement 2), p.29–39, 1980.
- DUNNE, L. D.; DISKIN, M. G; BOLAND, M. P.; O'FARRELL, K. J.; SREENAN, J. M. Nutrition and embryo survival in cattle. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, v.36, p.95 (abstract), 1997.
- DUNNE, L.D.; DISKIN, M.G.; BOLAND, M.P.; O'FARRELL, K.J.; SREENAN, J.M. The effect of pre- and post-insemination plane of nutrition on embryo survival in beef heifers. *Animal Science* v.69, p.411–417, 1999.
- ECHTERNKAMP, S. E.; HOWARD, R.J.; ROBERTS, A.J.; GRIZZLE, J.; WISE, T. Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. *Biology of Reproduction* v.51, p.971–981, 1994.
- ECHTERNKAMP, S.E.; SPICER, L.J.; GREGORY, K.E.; CANNING, S.F.; HAMMOND, J.M. Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biology of Reproduction* v.43, p.8–14, 1990.
- EDEY, T. N. Nutritional stress and pre-implantation embryonic mortality in Merino sheep. *Journal of Agricultural Science*, v.67, p.287-293, 1966.
- EHRHARDT, R.A.; SLEPETIS, R.M.; SIEGAL-WILLOT, J.; VAN AMBURGH, M.E.; BELL, A.W.; BOISCLAIR, A.W. Development of specific radioimmunoassay to measure

- physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *Journal of Endocrinology* v.166, p.519–528, 2000.
- embryo survival in goats following superovulation and embryo transfer. *Theriogenology*, v.17, n.1, p.76, 1982.
- ETHERTON, T.D.; BAUMAN, D.E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiology Reviews* v.78, p.745–761, 1998.
- FARIN, P. W.; FARIN, C. E.; YANG, L. In vitro production of bovine embryos is associated with altered fetal development. *Theriogenology*, v.41, p.193 (abstract), 1994.
- FARIN, P.W.; FARIN, C.E. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biology of Reproduction*, v.52, p.676-682, 1995.
- FARNWORTH, P.G. Gonadotrophin secretion revisited: how many ways can FSH leave a gonadotroph. *Journal of Endocrinology* v.145, p.387–395, 1995.
- FLEMING, J. V.; HAY, S. M.; HARRIES N.; REES, W. D. Effects of nutrient deprivation and differentiation on the expression of growth-arrest genes (gas and gadd) in F9 embryonal carcinoma cells. *Biochemical Journal*, v.330, p.573-579, 1998.
- FORTUNE, J. E.; CUSHMAN, R.A.; WAHL, C.M.; KITO, W.S. The primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology* v.163, p.53–60, 2000.
- FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction* v.50, p.225–232, 1994.
- FOSTER, D.L.; NAGATANI, S. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. *Biology of Reproduction* v.60, p.205–215, 1999.
- FOSTER, D.L.; OLSTER, D.H. Effect of restricted nutrition on puberty in the lamb patterns of tonic luteinising hormone (LH) secretion and competency of the LH surge system. *Endocrinology* v.116, p.375–381, 1985.
- FURNUS, C. C.; DEMATOS, D. G.; MARTINEZ, A. G.; MATKOVIC, M. Glucose and embryo quality. *Proceedings of Techniques for gamete manipulation and storage*, Hamilton, New Zealand, abstract n° 20, 1996.
- GALLOWAY, S.M.; MCNATTY, K.P.; CAMBRIDGE, L.M.; LAITINEN, M.P.E.; JUENGEL, J.L.; JOKIRANTA, T.S.; MCLAREN, R.S.; LUIRO, K.; DODDS, K.G.; MONTGOMERY, G.W.; BEATTIE, A.E.; DAVIS, G.H.; RIVITO, O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP 15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage sensitive manner. *Nature Genetics* v.25, p.279–283, 2000.
- GARCIA-WINDER,M.; IMAKAWA, K.; DAY,M.L.; ZALESKY, D.D.; KITTOCK, R.J.; KINDER, J.E. Effect of suckling and low doses of estradiol on luteinizing hormone secretion during the post-partum period in beef cows. *Domestic Animals Endocrinology*

v.3, p.79–86, 1986.

- GARDNER, D. K.; LANE, M.; SPITZER, A. e BATT, P. A. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. *Biology of Reproduction*, v.50; p.390-400, 1994.
- GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. The influence of nutrition on fertility in dairy cows. Pages 39–58 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. P. C. Garnsworthy and J. Wiseman, ed. Nottingham University Press, Nottingham, U.K, 1999.
- GARVERICK, H.A.; BAXTER, G.; GONG, J.; ARMSTRONG, D.G.; CAMPBELL, B.K.; GUTIERREZ, C.G.;WEBB, R. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding hypogonadotrophic cattle. *Reproduction* v.123, p.651–661, 2002.
- GAZAL, O.S.; LESHIN, L.S.; STANKO, R.L.; THOMAS, M.G.; KEISLER, D.H.; ANDERSON, L.L.; WILLIAMS, G.L Gonadotropin-releasing hormone secretion into third-ventricle cerebrospinal fluid of cattle: correspondence with the tonic and surge release of luteinizing hormone and its tonic inhibition by suckling and neuropeptide Y. *Biology of Reproduction* v.59, p.676–683, 1998.
- GIBBONS, J.R.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biology of Reproduction*. v.57, p.1066–1073, 1997.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. *Biology of Reproduction* v.65, p.638–647, 2001
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K. Activin A, estradiol and free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. *Biology of Reproduction* v.67, p.14–19, 2002b.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. *Reproduction* v.124, p.475–482, 2002a.
- GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. *Theriogenology* v.50, p.507–519, 1998.
- GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 h through depression of FSH concentrations. *Theriogenology* v.52, p.1079–1093, 1999.
- GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C. Emergence and deviation

of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* v.48, p.75–87, 1997.

GLISTER, C.; KEMP, C.F.; KNIGHT, P.G. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: Actions of BMP-4, -6, and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction* v.127, p.239–254, 2004.

GLISTER, C.; KNIGHT, P.G. Immunocytochemical evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) signaling system in bovine antral follicles. *Reproduction Abstract Series* v.29:5 (Abstract), 2002.

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

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

GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* v.97, p.247–254, 1993.

GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: Follicular populations and peripheral hormones. *Biology of Reproduction* v.45, p.941–949, 1991.

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

GONG, J.G.; MCBRIDE, D.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. *Journal of Endocrinology* v.143, p.157–164, 1994.

GONG, J.G.; MOGHADDAM, A.; BAXTER, G.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R.; ARMSTRONG, D.G. Effect of feeding a diet to increase circulating insulin concentrations on LH secretion during the early post-partum period in dairy cows. *Reproduction Abstract Series* v.27, Abstract No. 15.

GRANGER, A.L.; WYATT, W.E.; CRAIG, W.M.; THOMPSON, D.L.; HEMBRY, F.G. Effects of breed and wintering diet on growth puberty and plasma concentrations of growth hormone and insulin-like growth factor-I in heifers. *Domestic Animals Endocrinology* v.6, p.253–263, 1989.

- GREGG, D.W.; MOSS, G.E.; HUGGENS, R.E.; MALVEN, P.V. Endogenous opioid modulation of luteinising hormone and prolactin secretion in post-partum ewes and cows. *Journal of Animal Science* v.63, p.838–847, 1986.
- GREVE, T.; CALLESEN, H. Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. *Nord Vet Med*, v.35, p.408–21, 1983.
- GRIGSBY, M.E.; TRENKLE, A. Plasma growth hormone, insulin, glucocorticoids and thyroid hormones in large, medium and small breeds of steers with and without an estradiol implant. *Domestic Animals Endocrinology* v.3, p.261–267, 1986.
- GUTIERREZ, C.G.; CAMPBELL, B.K.; WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle stimulating hormone and morphological characteristics. *Biology of Reproduction* v.56, p.608–616, 1997b.
- GUTIERREZ, C.G.; GLAZYRIN, A.L.; ROBERTSON, G.W.; CAMPBELL, B.K.; GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Ultra-structural characteristics of bovine granulosa cells associated with maintenance of oestradiol production in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology* v.134, p.51–58, 1997a.
- GUTIERREZ, C.G.; OLDHAM, J.; BRAMLEY, T.A.; GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; WEBB, R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *Journal of Animal Science* v.75, p.1876–1884, 1997c.
- GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine antral follicles in long-term culture in vitro. *Biology of Reproduction* v.62, p.1322–1328, 2000.
- HANSEL, W.; CONVEY, E.M. Physiology of the estrous cycle. *Journal of Animal Science* v.57 (Supplement 2), p.404–424, 1983.
- HARRISON, L.M.; RANDEL, R.D. Influence of insulin and energy intake on ovulation rate, luteinizing hormone and progesterone in beef heifers. *Journal of Animal Science* v.63, p.1228–1235, 1986.
- HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; THOMPSON, J.G. Effect of the oxidative phosphorylation uncoupler, 2, 4-dinitrophenol on hypoxia-inducible factor-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Reproduction, Fertility and Development*, v.16, p.665-673, 2004.
- HASHIMOTO, S.; MINANI, N.; YAMADA, M.; IMAI, H. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Molecular Reproduction Development*, v.56, p.520-526, 2000.

- HIDALGO, C.O.; GÓME, E.; PRIETO, L.; DUQUE, P.; GOYACHE, F.; FERNÁNDEZ, L.; FERNÁNDEZ, I.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Pregnancy rates and metabolic profiles in cattle treated with propylene glycol prior to embryo transfer. *Theriogenology*, v.62, p.664–676, 2004.
- HINEY, J.K.; OJEDA, S.R.; DEES, W.L. Insulin-like growth factor-I: a possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. *Neuroendocrinology* v.57, p.420–423, 1991.
- HORTON, R.J.E.; CUMMINS, J.T.; CLARKE, I.J. Naloxone evokes large-amplitude GnRH pulses in luteal-phase ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* v.81, p.277–286, 1987.
- HOUSEKNECHT, K.L.; BAILE, C.A.; MATTERI, R.L.; SPURLOCK, M.E. The biology of leptin: a review. *Journal of Animal Science* v.76, p.1405–1420, 1998.
- HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKER, J.F.; SEVERS, M.M.; VAN DER DONK, J.A.; VAN DEN HURK, R. Effects of fetal bovine serum, FSH and  $17\beta$ -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology* v.44, p.217–226, 1995.
- IMAKAWA, K.; DAY, M.L.; GARCIA-WINDER, M.; ZALESKY, D.D.; KITTOK, R.J.; SCHANBACHER, K.D.; KINDER, J.E. Endocrine changes during restoration of oestrous cycles following induction of anoestrus by restricted nutrient intake in beef heifers. *Journal of Animal Science* v.63, p.565–571, 1986.
- IRELAND, J.J.; MIHM, M.; AUSTIN, E.; DISKIN, M.G.; ROCHE, J.F. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: Key concepts, studies, advancements, and terms. *Journal of Dairy Science* v.83, p.1648–1658, 2000.
- IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Development of non-ovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotrophins. *Endocrinology* v.112, p.150, 1983a.
- IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: Changes in concentrations of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotrophin to follicles. *Journal of Animal Science* v.57, p.157, 1983b.
- JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.J. Development and validation of a short-term, serum-free culture system for bovine granulose cells: Evaluation of the effects of somatotropin and growth hormone-releasing factor as estradiol production. *Journal of Dairy Science* v.85, p.68–78, 2002.
- JONES, J. L. e CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins:

- biological actions. *Endocrine Reviews*, v.16, p.3-34, 1995.
- JORRITSMA, R.; C'ESAR, M.L.; HERMANS, J.T.; KRINTWAGEN, C.L.J.J.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, v.81, p.225–235, 2004.
- JUENGEL, J.L.; HUDSON, N.L.; HEATH, D.A.; SMITH, P.; READER, K.L.; LAWRENCE, S.B.; O'CONNELL, A.R.; LAITINEN, M.P.E.; CRANFIELD, M.; GROOME, N.P.; RITVOS, O.; MCNATTY, K.P. Growth differential factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biology of Reproduction* v.67, p.1777–1789, 2002.
- KAKAR, M.A.; MADDOCKS, S.; LORIMER, M.F.; KLEEMANN, D.O.; RUDIGER, S.R.; HARTWICH, K.M.; WALKER, S.K. The effect of peri-conception nutrition on embryo quality in the superovulated ewe. *Theriogenology*, v.64, p.1090–1103, 2005.
- KAUR, H.; ARORA, S.P. Dietary effects on ruminant livestock production with particular reference to protein. *Nutrition Research Reviews* v.8, p.121–136, 1995.
- KEISLER, D.H.; DANIEL, J.A.; MORRISON, C.D. The role of leptin in nutritional status and reproductive function. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* v.54, p.425–435, 1999.
- KENDRICK K.W.; BAILEY T.L.; GARST A.S.; PRYOR A.W.; AHMADZADEH A.; AKERS R.M.; EYESTONE W.E.; PEARSON R.E.; GWAZDAUSKAS F.C. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating holstein cows using transvaginal follicular aspiration. *Journal of Dairy Science* v.82, p.1731- 1740, 1999.
- KHAN, J.R.; LUDRI, R.S. Hormone profile of crossbred goats during the periparturient period. *Tropical Animal Health and Production*, v.34, p.151-162, 2002.
- KIESSLING, A.A.; HUGHES, W.H.; BLANKEVOORT, M.R. Superovulation and embryo transfer in the dairy goat. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 188 p.829-832, 1986.
- KILE, J.P.; ALEXANDER, B.M.; MOSS, G.E.; HALLFORD, D.M.; NETT, T.M. Gonadotrophin-releasing hormone overrides the negative effect of reduced dietary energy on gonadotrophin synthesis and secretion in ewes. *Endocrinology* v.128, p.843–849, 1991.
- KIM, J.H.; FUNAHASHI H.; NIWA, K.; OKUDA, K. Glucose requirement at different developmental stages of *in vitro* fertilized bovine cultured in semi-defined medium. *Theriogenolgy*, v.39, p.875-886, 1993.

- KINDER, J.E.; BERGFELT, E.G.M.; WEHRMAN, M.E.; PETERS, K.E.; KOJIMA, F.N. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. *Journal of Reproduction and Fertility (Supplement)* v.49, p.393–407, 1995.
- KIRBY, C.J.; THATCHER, W.W.; COLLIER, R.J.; SIMMEN, F.A.; LUCY, M.C. Effects of growth hormone and pregnancy on expression of growth receptor, insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 genes in bovine uterus, ovary and oviduct. *Biology of Reproduction* v.55, p.996–1002, 1996.
- KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatins in the ovary. *Reproduction* v.121, p.503–512, 2001.
- KOBAYASHI, Y.; BOYD, C.K.; BRACKEN, C.J.; LAMBERSON, W.R.; KEISLER, D.H.; LUCY, M.C. Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinology* v.140, p.3947–3954, 1999.
- KOBAYASHI, Y.; BOYD, C.K.; MCCORMACK, B.L.; LUCY, M.C. Reduced insulin-like growth factor-I after acute feed restriction in lactating dairy cows is independent. *Journal of Dairy Science* v.85, p.748–754, 2002.
- KOJIMA, F.N.; BERGFELD, E.G.M.; WEHRMAN, M.E.; CUPP, A.S.; FIKE, K.E.; MARISCAL-AGUAYO, D.V.; SANCHEZ-TORRES, T.; GARCIA-WINDER, M.; CLOPTON, D.T.; ROBERTS, A.J.; KINDER, J.E. Frequency of hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentration of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. *Animal Reproduction Science* v.77, p.187–211, 2003.
- KRUIP, T.A.M.; WENSING, T.; VOS, P.L.A.M. Characteristics of abnormal puerperium in dairy cattle and the rationale for common treatments. In: Diskin, M.G. (Ed.), *Fertility in the High Producing Dairy Cow*. Occasional Publication No. 26. British Society of Animal Science, Edinburgh, p.63–79, 2001.
- KULICK, L.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology* v.52, p.913–921, 1999.
- LANE M.; GARDNER, D.K. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations associated loss of viability of mouse blastocysts. *Human Reproduction*, v.13, p.991–997, 1998.
- LASSOUED, N.; REKIK, M.; MAHOUACHI, M.; BEN HAMOUDA, M. The effect of nutrition prior to and during mating on ovulation rate, reproductive wastage, and lambing

rate in three sheep breeds. *Small Ruminant Research* v.52, p.117–125, 2004.

- LEESE, H.J. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *Bioessays* v.24, p.845–849, 2002.
- LEEUWENBERG, B.R.; HURST, P.R.; MCNATTY, K.P. Expression of IGF-I mRNA in the ovine ovary. *Journal of Molecular Endocrinology* v.15, p.251–258, 1995.
- LEROY, J.L.M.R.; GOOSSENS, L.; GELDHOF, A.; VANHOLDER, T.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Embryo quality and color in Holstein Friesian and Belgian Blue cattle in relation to donor blood cholesterol and triglycerides. *Reproduction, Fertility and Development* v.16, p.211, 2004b.
- LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P.E.J.; DE KRUIF, A. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Animal Reproduction Science* v.80, p.201–211, 2004a.
- LEYVA, V.; BUCKRELL, B.C.; WALTON, J.S. Follicular activity and ovulation regulated by exogenous progestagen and PMSG in anestrous ewes. *Theriogenology*, 50: 377-393, 1998.
- LIM, J.M.; REGGIO, B.C.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. Development of in-vitro-derived bovine embryos culture in 5% CO<sub>2</sub> in air or in 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. *Human Reproduction*, v.14, p.458-464, 1999.
- LORTON, S.P.; FIRST N.L. Hyaluronidase does not disperse the cumulus oophorus surrounding bovine ova. *Biology of Redrofuction*, v.21, p.301-308, 1979.
- LOZANO, J.M.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; O'CALLAGHAN, D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction*, v.125, p.543–553, 2003.
- LUCY, M.C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction in Domestic Ruminants V. Reproduction Supplement* v.61, p.415–417, 2003.
- LUCY, M.C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropins and insulin-like growth factors in cattle. *Journal of Dairy Science* v.83, p.1635–1647, 2000.
- LUCY, M.C.; BILBY, C.R.; KIRBY, C.J.; YUAN, W.; BOYD, C.K. Role of growth hormone in development and maintenance of follicles and corpora lutea. *Journal of Reproduction and Fertility (Supplement)* v.54, p.49–59, 1999.
- LUCY, M.C.; BOYD, C.K.; KOENIGSFELD, A.T.; OKAMURA, C.S. Expression of somatotrophin receptor messenger ribonucleic acid in bovine tissues. *Journal of Dairy Science* v.81, p.1889–1895, 1998.

- LUCY, M.C.; STAPLES, C.R.; MICHEL, F.M.; THATCHER, W.W. Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early post-partum dairy cows. *Journal of Dairy Science* v.74, p.473–482, 1991
- MACKEY, D.R.; SCREENAN, J.M.; ROCHE, J.F.; DISKIN, M.G. Effect of acute nutritional restriction on the incidence of anovulation and periovulatory estradiol and gonadotropin concentrations in beef heifers. *Biology o Reproduction* v.61, p.1601–1607, 1999.
- MACKEY, D.R.; WYLIE, A.R.G.; SREENAN, J.M.; ROCHE, J.F.; DISKIN, M.G. The effect of acute nutritional change on follicle wave turnover, fgonadotropin, steroid concentration in beef heifers. *Journal of Animal Science* v.78, p.429–442, 2000.
- MAHMOUD, A.I.; THOMPSON, F.N.; PECK, D.D.; MIZINGA, K.M.; LESHIN, L.S.; RUND, L.A.; STUDEMANN, J.A.; KISER, T.E. Difference in luteinizing hormone response to an opioid antagonist in beef heifers and cows. *Biology of Reproduction* v.41, p.431–437, 1989.
- MANI, A.U.; MCKELVEY, W.A.C.; WATSON, E.D. The effects of low leve of feeding on response to synchronization of estrous, ovulation rate and embryo loss in goats. *Theriogenology*, 38, p.1013-1022, 1992.
- MANTOVANI, R.; ENRIGHT, W. J.; KEANE, M. G.; ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P. Effect of nutrition and dose of follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers. *Proceedings of the 9<sup>th</sup> meeting of the Association Europeenne de Transfert Embrionnaire*, abstract n° 234, Lyon, 1993.
- MARTIN, R.; ENRIGHT, W. J.; KEANE, M. G.; ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P. The effects of maternal hiperglycaemia on embryonic development in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.21, p.37 (abstract), 1998.
- MATSUYAMA K.; MIYAKOSHI, H.; FUKUI, Y. Effect of glucose during the in vitro culture in synthetic oviducto fluid medium on in vitro development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, v.40, p.595-605, 1993.
- MAURASSE, C.; MARTON, P.; DUFOUR, J.J. Ovarian follicular populations at two stages of an oestrus cycle in heifers given high energy diets. *Journal of Animal Science*, v.61, p.1194–200, 1985.
- MAXFIEL, E.K.; SINCLAIR, K.D.; DUNNE, L.D.; BROADBENT, P.J.; ROBINSON, J.J.; STEWART, E.; KYLE, D.G. ; MALTIN, C.A. Temporary exposure of ovine embryos to an advanced uterine environment does not affect fetal weight but alters fetal muscle development. *Biology of Reproduction*, v.59, p.321-325, 1998.

- MAXFIELD, E. K.; SINCLAIR, K. D.; DOLMAN, D. F.; STAINES, M. E.; MALTIN, C. A. In vitro culture of sheep embryos increases weight, primary fibre size and secondary to primary fibre ratio in fetal muscle at day 61 of gestation. *Theriogenology*, v.47, p.376 (abstract), 1997.
- MAZERBOURG, S.; ZAPF, J.; BAR, R.S.; BRIGSTOCK, D.R.; MONGET, P. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 proteolytic degradation in bovine, equine, and porcine preovulatory follicles: Regulation by IGF and heparin-binding domain-containing peptides. *Biology of Reproduction* v.63, p.390–400, 2000.
- MCCAFFERY, F.H.; LEASK, R.; RILEY, S.C.; TELFER, E.E. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biology of Reproduction* v.63, p.267–273, 2000.
- MCCANN, J.P.; HANSEL, W. Relationship between insulin and glucose metabolism and pituitary-ovarian function in fasted heifers. *Biology of Reproduction* v.34, p.630–641, 1986.
- MCEVOY, T. G.; SINCLAIR, K. D.; STAINES, M. E.; ROBINSON, J. J.; ARMSTRONG, D. G.; WEBB, R. In-vitro blastocyst production in relation to energy and protein intake prior to oocyte collection. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.19, p.132 (abstract), 1997.
- MCEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J. Nutrition of the dam and growth of the foetus. In: Maillard, R. (Ed.), *Gestation. Journées Européennes organisées par la Société Française de Buiatrie*. Société Française de Buiatrie, Paris, p.159–169, 2002.
- MCEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J.;AITKEN, R.P.; FINDLAY, P.A.; PALMER, R.M.; ROBINSON, I.S. Dietary-induced suppression of preovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs subsequent in vivo and in vitro development of ova. *Animal Reproduction Science* v.39, p.89–107, 1995.
- MCGUIRE, M.A.; DWYER, D.A.; HARRELL, R.J.; BAUMAN, D.E. Insulin regulates insulin-like growth factors and some of their binding proteins in lactating cows. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* v.269, p.723–730, 1995.
- MCGUIRE, M.A.; VICINI, J.L.; BAUMAN, D.; VEENHUIZEN, J.J. Insulin-like growth factors and their binding proteins in ruminants and their nutritional regulation. *Journal of Animal Science* v.70, p.2901–2910, 1992.
- MCNATTY, K.P.; HEATH, D.A.; LINDY, F.; FIDLER, A.E.; QUIRKE, L.; O'CONNELL, A.; SMITH, P.; GROOME, N.; TISDALL, D.J. Control of early ovarian follicular development *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* v.54, p.3–16, 1999.

- MCNATTY, K.P.; JUENGEL, J.L.; WILSON, T.; GALLOWAY, S.M.; DAVIS, G.H.; HUDSON, N.L.; MOELLER, C.C.; CRANFIELD, M.; READER, K.L.; LAITINEN, M.P.E.; GROOME, N.P.; SAWYER, H.R.; RITVOS, O. Oocyte-derived growth factors and ovulation rate in sheep. *Reproduction in Domestic Ruminants V. Reproduction Supplement* v.61, p.339–351, 2003.
- MCNEILLY, A.S.; BROOKS, J.; MCNEILLY, J.R.; BROWN, P. Synthesis and release of FSH. *J. Reproduction and Fertility* v.15, p.2 (Abstract Series), 1995.
- MCSHANE, T.M.; MAY, T.; MINER, J.L.; KEISLER, D.H. Central actions of neuropeptide-Y may provide neuromodulatory link between nutrition and reproduction. *Biology of Reproduction* v.46, p.1151–1157, 1992.
- MCSHANE, T.M.; PETERSON, S.L.; MCCRONE, S.; KEISLER, D.H. Influence of food restriction on neuropeptide-Y, pro-opiomelanocortin, and luteinising hormone-releasing hormone gene expression in sheep hypothalmi. *Biology of Reproduction* v.49, p.486–492, 1993.
- MEDINA, C.L.; NAGATANI, S.; DARLING, T.A.; BUCHOLTZ, D.C.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K.I.; FOSTER, D.L. Glucose availability modulates the timing of the luteinising hormone surge in the ewe. *Journal of Endocrinology* v.10, p.785–792, 1998.
- MENASHE, Y.; SACK, J.; MASHINACH, S. Spontaneous pregnancies in two women with Laron-type dwarfism: are growth hormone and circulating insulin-like growth factor mandatory for induction of ovulation. *Human Reproduction* v.6, p.670–671, 1991.
- MIHM, M.; AUSTIN, E.J.; GOOD, T.E.M.; IRELAND, J.L.H.; KNIGHT, P.G.; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction* v.63, p.811–819, 2000.
- MIHM, M.; GOOD, T.E.M.; IRELAND, J.L.H.; IRELAND, J.J.; KNIGHT, P.; ROCHE, J. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicle in heifers. *Biology of Reproduction* v.57, p.1328–1337, 1997.
- MIYOSHI, S.; PATE, J.L.; PALMQUIST, D.L. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v.68, n.2, p.29-43, 2001.
- MOENTER, S.M.; CARATY, A.; LOCATELLI, A.; KARSCH, F.J. Pattern of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology* v.129, p.1175–1182, 1991.
- MOLENTO, C.F.M.; BLOCK, E.; CUE, R.I.; PETICLERC, D. Effects of insulin, recombinant bovine somatotropin, and their interaction on insulin-like growth factor-I

secretion and milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Science* v.85, p.738–747, 2002.

MONGET P.; MAZERBOURG, S.; DELPUECH, T.; MAUREL, M.C.; MANIERE, S.; ZAPF, J.; LALMANACH, G.; OXVIG, C.; OVERGAARD, M.T. Pregnancy-associated plasma protein A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation. *Biology of Reproduction* v.68, p.77–86, 2003.

MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSEN, J.M.; MAZERBOURG, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic Animals Endocrinology* v.23, p.139–154, 2002.

MONGET, P.; MARTIN, G.B. Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Human Reproduction* v.12 (Supplement 1) p.33–51, 1997.

MONTGOMERY, G.W.; GALLOWAY, S.M.; DAVIS, G.H.; MCNATTY, K.P. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction* v.121, p.843–852, 2001.

MORAN, C.; QUIRKE, J.F.; ROCHE, J.F. Puberty in heifers: a review. *Animal Reproduction Science* v.18, p.167–182, 1989.

MORIMOTO, S.; FERNANDEZ-MEJIA, C.; ROMERRO-NAVARRO, G.; MORALES-PEZA, N.; DIAZ-SANCHEZ, V. Testosterone effect on insulin content, messenger ribonucleic acid levels, promotor activity, and secretion in rats. *Endocrinology* v.142, p.1442–1447, 2001.

MORRISON, C.D.; DANIEL, J.A.; BUFF, P.R.; KEISLER, D.H. Continuous, intracerebroventricular infusion of neuropeptide Y induces a prolonged suppression of LH. *Journal of Animal Science* v.77 (Supplement 1), p.216 (Abstract), 1999.

MULSANT, P.; LECERF, F.; FABRE, S.; BODIN, L.; THIMONIER, J.; MONGET, P.; LANNELUC, I.; MONNIAUX, D.; TEYSSIER, J.; ELSEN, J.M. Prolificacy genes in heep: The French genetic program. *Reproduction in Domestic Ruminants V. Reproduction Supplement* v.61, p.353–359, 2003.

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

- NANDRA, A.S.; BRAR, P.S.; PRABHAKAR, S. Enhancing reproductive performance in dairy buffalo: major constraints and achievements. *Reproduction Supplement* v.61, p.27–36, 2003.
- NICHOLAS, B.L.; WEBB, R.; ARMSTRONG, D.G. Characterization of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) protease activity in bovine theca cell conditioned media. *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series* v.25, p.52 (Abstract), 2000.
- NOLAN, R.; O'CALLAGHAN, D.; DUBY, R. T.; LONERGAN, P.; BOLANG, M. P. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology*, v.50, p.1263-1274, 1998.
- NUGENT, R.A.; JENKINS, T.G.; ROBERTS, A.J.; KLINDT, J. Relationship of post-partum interval in mature beef cows with nutritional environment biological type and serum IGF-I concentrations. *Animal Production* v.56, p.193–200, 1993.
- O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M.P. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Animal Science (Pencaitland)* v.68, p.299–314, 1999.
- PARKER, K.I.; ROBERTSON, D.M.; GROOME, N.P.; MACMILLAN, K.L. Plasma concentrations of inhibin A and follicle stimulating hormone differ between cows and two or three waves of ovarian follicular development in a single estrous cycle. *Biology of Reproduction* v.68, p.822–828, 2003.
- PAULA, N.R.O; GALEATI, G.; TEIXEIRA, D.I.A; LOPES JÚNIOR, E.S.; FREITAS, V.J.F.; RONDINA, D. Responsiveness to progestagen-eCG-cloprostenol treatment in goat food restricted for long period and refed. *Reproduction in Domestic Animals*, v.40, p.1-3, 2005.
- PENDLETON, R.J.; YOUNGS, C.R.; RORIE, R.W.; POOL, S.H.; MEMON, M.A.; GODKE, R.A. Comparison of fluorogestone acetate sponges with norgestomet implants for induction of estrus and ovulation in anestrous dairy goats. *Small Ruminant Research* v.8, p.269-273, 1992.
- PERKS, C.M.; DENNING-KENDALL, P.A.; GILMOUR, R.S.; WATHES, D.C. Localization of messenger ribonucleic acids for insulinlike growth factor-I (IGF-I), IGF-II and the type 1 IGF receptor in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. *Journal of Endocrinology* v.136, p.5266–5273, 1995.
- PERKS, C.M.; PETERS, A.R.; WATHES, D.C. Follicular and luteal expression of insulin-like growth factor I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* 116:157–165, 1999.

- RAE, M.T.; PALASSIO, S.; KYLE, C.E.; BROOKS, A.N.; LEA, R.G.; MILLER, D.W.; RHIND, S.M. Maternal undernutrition during pregnancy retards early ovarian development and subsequent follicular development in fetal sheep. *Reproduction* v.122, p.915–922, 2001.
- RAE, M.T.; RHIND, S.M.; FOWLER, P.A.; MILLER, D.W.; BROOKS, A.N. Effect of maternal undernutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen-responsive period in male sheep fetuses. *Reproduction* v.124, p.33–39, 2002a.
- RAE, M.T.; RHIND, S.M.; KYLE, C.E.; MILLER, D.W.; BROOKS, A.N. Maternal undernutrition alters triiodothyronine concentrations and pituitary response to GnRH in fetal sheep. *Journal of Endocrinology*, v.173, p.449–455, 2002b.
- RASBY, R.J.; WETTEMANN, R.P.; GEISERT, R.D.; WAGNER, J.J.; LUSBY, K.S. Influence of nutrition and body condition on pituitary, ovarian, and thyroid function of non-lactating beef cows. *Journal of Animal Science* v.69, p.2073–2080, 1991.
- RAUSCH, M.I.; TRIPP, M.W.; GOVONI, K.E.; ZANG, W.; WEBER, W.J.; CROOKER, B.A.; HOAGLAND, T.A.; ZINN, S.A. The influence of level of feeding on growth and serum insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding proteins in growing beef cattle supplied with somatotropin. *Journal of Animal Science* v.80, p.94–100, 2002.
- RHIND, S.M. Nutrition: its effects on reproductive performance and its hormonal control in female sheep and goats. In: Speedy, A.W. (Ed.), *Progress in sheep and goat research*. CAB International, Oxford, p.25–51, 1992.
- RHIND, S.M.; ELSTON, D.A.; JONES, J.R.; REES, J.R.; MCMILLEN, S.R.; GUNN, R.G. Effects of restriction of growth and development of Brecon Cheviot ewe lambs on subsequent lifetime reproductive performance. *Small Ruminant Research* v.30, p.121–126, 1998.
- RHIND, S.M.; MACNEILLY, A.S. Effects of level of food intake on ovarian follicle number, size and steroidogenic capacity in the ewe. *Animal Reproduction Science*, v.52, p.131-138, 1998.
- RHIND, S.M.; MACNEILLY, A.S. Effects of level of food intake on ovarian follicle number, size and steroidogenic capacity in the ewe. *Animal Reproduction Science*, v.52, p.131-138, 1998.
- RHIND, S.M.; MCKELVEY, W.A.C.; MCMILLEN, S.R.; GUNN, R.G.; ELSTON, D.A. Effect of restricted food intake, before and/or after mating, on the reproductive performance of greyface ewes. *Animal Production* v.48, p.149–155, 1989.

- RHODES, F.M.; ENTWISTLE, K.W.; KINDER, J.E. Changes in ovarian function and gonadotrophin secretion preceding the onset of nutritionally induced anoestrus in *Bos indicus* heifers. *Biology of Reproduction* v.55, p.1437–1443, 1996.
- RHODES, F.M.; FITZPATRICK, L.A.; ENTWISTLE, K.W.; DE'ATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. *Journal of Reproduction and Fertility* V.104, p.41–49, 1995.
- RICHARDS, M.W.; SPITZER, J.C.; WARNER, M.B. Effect of varying levels of post-partum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *Journal of Animal Science* v.62, p.300–306, 1986.
- RICHARDS, M.W.; WELLEMAN, R.P.; SPICER, L. J.; MORGAN, C.L. Nutritional anestrus in beef cows: Effect of body condition and ovariectomy on serum luteinizing hormone and insulin-like growth factor-I. *Biology of Reproduction* v.44, p.961–966, 1991.
- RICHARDS, M.W.; WETTEMANN, R.P.; SCHOENEMANN, H.M. Nutritional anoestrus in beef cows: body weight change, body condition, luteinising hormone in serum and ovarian activity. *Journal of Animal Science* v.67, p.1520–1526, 1989.
- RIVERA, G.M.; CHANDRASEKHER, Y.A.; EVANS, A.C.O.; GIUDICE, L.C.; FORTUNE, J.E. A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. *Biology of Reproduction* v.65, p.102–111, 2001.
- RIVERA, G.M.; FORTUNE, J.E. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins-4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology* v.144, p.2977–2987, 2003b.
- RIVERA, G.M.; FORTUNE, J.E. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. *Endocrinology* v.144, p.437–446, 2003a.
- ROBERTS, A.J.; NUGENT, R.A.; KLINDT, J.; JENKINS, T.G. Circulating insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, growth hormone, and resumption of oestrus in post-partum cows subjected to dietary energy restriction. *Journal of Animal Science* v.75, p.1909–1917, 1997.
- ROBINSON JJ. Nutrition and reproduction. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.25–34, 1996.
- ROBINSON, J.J. Nutrition in the reproduction of farm animals. *Nutrition Research Reviews*, v.3, p.253-276, 1990.

- ROBINSON, J.J.; ASHWORTH, C.J.; ROOKE, J.A.; MITCHELL, L.M.; MCEVOY, T.G. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Animal Feed Science and Technology*, v.126, p,259–276, 2006.
- ROBINSON, J.J.; ROOKE, J.A.; MCEVOY, T.G. Nutrition for conception and pregnancy. In: *Sheep nutrition* Freer M., Dove H. (eds), CABI Publishing CSIRO Publishing, Canberra, p.189-211, 2002
- ROCHE, J.F.; DISKIN, M.G. Hormonal regulation of reproduction and interactions with nutrition in female ruminants. In: Proceedings of the Eighth International Symposium on Ruminant Physiology, September 1994, Willengen, Germany, 1994.
- ROCHE, J.F.; MIHM, M.; DISKIN, M.G.; IRELAND, J.J. A review of regulation of follicle growth in cattle. *Journal of Animal Science* v.76 (Supplement 3), p.16–29, 1998.
- RONDINA, D. ; FREITAS, V. J. F. ; AMORIM, C. A. ; MAFUCCI, A. ; CONTI, S. ; CECCHI, R. ; PAULA, N. R. O. ; MARTINI, A. . Preantral follicular development in massese lambs born in two seasons of the year. *Small Ruminant Research*, Amsterdam, v. 57, p. 277-280, 2005.
- ROOKE, J.A.; EWEN, M.; MACKIE, K.; STAINES, M.E.; MCEVOY, T.G.; SINCLAIR, K.D. Effect of ammonium chloride on the growth and metabolism of bovine ovarian granulosa cells and the development of ovine oocytes matured in the presence of bovine granulosa cells previously exposed to ammonium chloride. *Animal Reproduction Science* v.84, p.53–71, 2004.
- ROYAL, M.D.; DARWASH, A.O.; FLINT, A.P.F.; WEBB, R.; WOOLLIAMS, J.A.; LAMMING, G.E. Declining fertility in dairy cattle: Changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Animal Science (Pencaitland)* v.70, p.487–502, 2000.
- RUBIO, J. M.; HALLFORD, D. M.; HAWKINS, D. E. Effect of glucose administration during estrous cycle on serum hormone profiles, mRNA for steroidogenic enzymes, and breeding performance of ewes. *Journal of Animal Science*, v.75, p.775-780, 1997.
- RUTTER, L.M.; SNOPEK, R.; MANNS, J.G. Serum concentrations of IGF-I in post-partum beef cows. *Journal of Animal Science* v.67, p.2060–2066, 1989.
- SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M.; IZAIKE, Y. In vitro culture of bovine preantral follicles. *Animal Reproduction Science* v.63, p.27–39, 2000.
- SAUER, F.D.; ERFLE, J.D.; FISHER, L.J. Propylene glycol and glycerol as a feed additive for lactating dairy cows: an evaluation of blood metabolite parameters. *Canadian Journal of Animal Science* v.53, p.265–271, 1973.
- SCARAMUZZI R. J.; MURRAY J. F. The nutrient requirements for the optimum production of gametes in assisted reproduction in ruminant animals. X° Réunion A.E.T.E.

9-10 September 1994 - Lion (France), 85-103, 1994.

- SCHAMS, D.; BENSHA, B.; KROSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.M. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. *Domestic Animals Endocrinology* v.22, p.51–72, 2002.
- SCHMIDT, M.; GREVE, T.; AVERY, B.; SULON, J.; HANSEN, H.B. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced embryos. *Theriogenology*, v.46, p.527-539, 1996.
- SELK, G.E.; WETTEMANN, R.P.; LUSBY, K.S.; OLTJEN, J.W.; MOBLEY, S.L.; RASBY, R.J.; GARMENDIA. Relationships among weight change, body condition and reproductive performance of range beef cows, *Journal of Animal Science* v.66, p.3153–3159, 1988.
- SELVARAJU, S.; AGARWAL, S. K.; KARCHE, S. D.; MAJUMDAR A. C. Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats treated with insulin. *Theriogenology*, v.59, p.1459-1468, 2003.
- SILVA, K.M.; PRICE, C.A. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage as bovine granulosa cells in vitro. *Biology of Reproduction* v.62, p.186–191, 2001.
- SIMPSON, R.B.; CHASE JR., C.C.; SPICER, L.J.; VERNAN, R.K.; HAMMOND, A.L.; RAE, D.O. Effects of exogenous insulin on plasma and follicular insulin like growth factor I, insulin like growth factor binding activity, follicular oestradiol and progesterone and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. *Journal of Reproduction and Fertility* V.102, p.483–492, 1994.
- SIMPSON, R.B.; CHASE, C.C.; SPICER, L.J.; CAROLL, J.A.; HAMMOND, A.C.; WELSH, T.H. Effect of exogenous estradiol on plasma concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor-I, insulin- like growth factor binding protein activity, and metabolites in ovariectomized Angus and Brahman cows. *Domestic Animals Endocrinology* v.14, p.367–380, 1997.
- SINCLAIR, K. D.; MAXFIELD, E. K.; ROBINSON, J. J.; MALTIN, C. A.; MCEVOY, T. G.; DUNNE, L. D.; YOUNG, L. E. e BROADBENT, P. J. Culture of sheep zygotes can alter fetal growth and development. *Theriogenology*, v.47, p.380 , 1997.
- SINCLAIR, K.D.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, J.S.M. Naloxone evokes a nutritionally dependent LH response in post-partum beef cows but not in mid-luteal phase

- maiden heifers. *Journal of Animal Science* v.61, p.219–230, 1995.
- SINCLAIR, K.D.; REVILLA, R.; ROCHE, J.F.; QUINTANS, G.; SANZ, A.; MACKEY, D.R.; DISKIN, M.G. Ovulation of the first dominant follicle arising after day 21 postpartum in suckling beef cows. *Journal of Animal Science* v.75, p.115–126, 2002.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology* v.127, p.916–925, 1990.
- SKINNER, D.C.; CARATY, A.; MALPAUX, B.; EVANS, N.P. Simultaneous measurement of gonadotropin-releasing hormone in the third ventricle cerebrospinal fluid and hypophyseal portal blood of the ewe. *Endocrinology* v.138, p.4699–4704, 1997.
- SKINNER, D.C.; MALPAUX, B.; DELALEU, B.; CARATY, A. Luteinising hormone (LH)-releasing hormone in third ventricular cerebrospinal fluid of ewe: correlation with LH pulses and the LH surge. *Endocrinology* v.136, p.3230–3237, 1995.
- SMITZ, J.E.; CORTVINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* v.123, p.185–202, 2002.
- SNIJDERS, S.E.M.; DILLON, P.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M.P. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on *in vitro* oocyte development in dairy cows. *Theriogenology* v.53, p.981–989, 2000.
- SNIJDERS, S.E.M.; DILLON, P.G.; O'FARRELL, K.J.; DISKIN, M.G.; WYLIE, A.R.G.; O'CALLAGHAN, D.; RATH, M.; BOLAND, M.P. Genetic merit for milk production and reproductive success in dairy cows. *Animal Reproduction Science* v.65, p.17–21, 2001.
- SOLDANI, R.; CAGNACCI, A.; PAOLETTI, A.M.; YEN, S.S.; MELIS, G.B. Modulation of anterior pituitary luteinizing hormone response to gonadotropin-releasing hormone by insulin-like growth factor I in vitro. *Fertility and Sterility* V.64, p.634–637, 1995.
- SOUZA, C.J.H.; CAMPBELL, B.K.; MCNEILLY, A.S.; BAIRD, D.T. Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction* v.123, p.363–369, 2002.
- SOUZA, C.J.H.; CAMPBELL, B.K.; MCNEILLY, A.S.; BAIRD, D.T. What the known phenotypes of the Booroola mutation can teach us about its mechanism of action? *Reproduction in Domestic Ruminants V. Reproduction Supplement* v.61, p.361–370, 2003.
- SPICER LJ, FRANCISCO CC. The adipose obese gene product leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* v.138, p.3374–3379, 1997.
- SPICER, L.J. Leptin: A possible metabolic signal affecting reproduction. *Domestic*

- Animals Endocrinology v.21, p.251–270, 2001.
- SPICER, L.J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S.E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. Journal of Animal Science 71, p.1232–1241, 1993.
- SPICER, L.J.; CHAMBERLAIN, C.S. Production of insulinlike growth factor-I by granulosa cells but not thecal cells is hormonally responsive in cattle. Journal of Animal Science v.38, p.2919–2926, 2000.
- SPICER, L.J.; CHAMBERLAIN, C.S.; MACIEL, S.M. Influence of gonadotropins on insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. Domestic Animals Endocrinology v.22, p.237–254, 2002.
- SPICER, L.J.; CHAMBERLAIN, G.L.; MORGAN, G.L. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins during preovulatory follicular development in cattle. Domestic Animals Endocrinology v.21, p.1–15, 2001.
- SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. Domestic Animals Endocrinology v.12, p.223–245, 1995.
- SPICER, L.J.; STEWART, R.E. Interaction among bovine somatotropin, insulin, and gonadotrophins on steroid production by bovine granulosa and theca cells. Journal of Dairy Science v.79, p.813–821, 1996.
- STAGG, K. Anoestrus in the post-partum suckled beef cow and in the nutritionally restricted beef heifer. Ph.D. Dissertation. The National University of Ireland, Dublin, 2000.
- STAGG, K.; SPICER, L.J.; SREENAN, J.M.; ROCHE, J.F.; DISKIN, M.G. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotrophin and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. Biology of Reproduction v.59, p.777–783, 1998.
- STEWART, R.E.; SPICER, L.J.; HAMILTON, T.D.; KEEFER, B.E. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. Journal of Animal Science v.73, p.3719–3731, 1995.
- STEWART, R.E.; SPICER, L.J.; HAMILTON, T.D.; KEEFER, B.E.; DAWSON, L.J.; MORGAN, G.L.; ECHTERNKAMP, S.E. Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles.

- Stock, A.E.; Fortune, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between pronged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* v.132, p.1108–1114, 1993.
- SUNDERLAND, S.J.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series* V.101, p.547–555, 1994.
- SUTTON, M.L.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T.; KIND, K.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction*, v.126, p.27-34, 2003.
- SUTTON-MCDOWAL, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Effect of hexoses and gonadotrophin supplementation on bovine oocyte nuclear maturation during in a synthetic follicle fluid medium. *Reproduction, Fertility and Development*, v.17, p.407-415, 2005.
- SUTTON-MCDOWALL, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Cumulus expansion and glucose utilization by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction*, v.128, p.314-319, 2004.
- TAMANINI, C.; BONO, G.; CAIROLI, F.; CHIESA, F. Endocrine responses induced in anestrous goats by the administration of different hormones after a fluorogestone acetate treatment. *Animal Reproduction Science*, v.9, p.357-364, 1985.
- TATMAN, W.R.; JUDKINS, M.B.; DUNN, T.G.; MOSS, G.E. Luteinising hormone in nutrient-restricted ovariectomised ewes. *Journal of Animal Science* v.68, p.1097–1102, 1990.
- THISSEN, J.P.; KETELSLEGERS, J.M.; UNDERWOOD, L.E. Nutritional regulation of the insulin-like growth-factors. *Endocrinology Reviews* v.15 p.80–101, 1994.
- THOMAS, F.H.; LEASK, R.; SISEN, V.; RILEYS, S.C.; SPEARS, N.; TELFER, E.E. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term cultures. *Reproduction* v.122, p.487–495, 2001.
- THOMPSON, J. G.; GARDNER, D. K.; PUGH, P. A.; MCMILLAN, W. H.; TERVIT, H. R. Lamb birthweight following transfer is affected by the culture system used for pre-elongation development of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility Series*, v.13, p.25 (abstract), 1994.

- THOMPSON, J.G. The impact of nutrition on the cumulus oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants. *Journal of Reproduction and Development*, v.52, p.169-175, 2006.
- THOMPSON, J.G.; GARDNER, D.K.; PUGH, P.A.; MCMILLAN, W.H.; TERVIT, H.R. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biology of Reproduction*, v.53, p.1385-1391, 1995.
- THOMPSON, J.G.; MCNAUGHTON, C.; GASPARINI, B.; MCGOWAN, L.T.; TERVIT, H.R. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and balstulation of bovine embryos cultured in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.118, p.47-55, 2000.
- THOMPSON, J.G.; PARTRIDGE, R.J.; HOUGHTON, F.D.; COX, C.I.; LESSE, H.J. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.106, p.299-306, 1996.
- THOMPSON, J.G.; WALES, R.G. Observations on the loss of the cellular vestment surrounding superovulated sheep oocytes. *Animal Reproduction Science*, v.15, p.169-175, 1987.
- VANDEHAAR, M.J.; SHARMA, B.K.; FOGWELL, R.L. Effect of dietary energy restriction on the expression of insulin-like growth factor 1 in liver and corpus luteum of heifers. *Journal of Dairy Science* v.78, p.832-841, 1995.
- VESTERGAARD M.; PURUP, S.; HENCKEL, P.; TONNER, E.; FLINT, D.J.; JENSEN, L.R.; SERJRSSEN, K. Effects of growth hormone and ovarioectomy on performance, serum hormones, insulin-like growth factor binding proteins, and muscle fibre properties of prepubertal Friesian heifers. *Journal of Animal Science* v.73, p.3574-3584, 1995.
- VIÑOLES G. Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe Doctoral Thesis, Uppsala, Sweden: Department of Clinical Chemistry, Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, 2003.
- VIZCARRA, J.A.; WETTEMANN, R.P.; SPITZER, J.C.; MORRISON, D.G. Body condition at parturition and post-partum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin, and non-esterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. *Journal of Animal Science* v.76, p.927-936, 1998.
- WALKER, S. K.; HEARD, T. M. E SEAMARK, R. F. In vitro culture of sheep embryos without co-culture: successes and perspectives. *Theriogenology*, v.37, p.11-126, 1992.
- WANDJI, S.A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M.A. Ontogeny and cellular localization of <sup>125</sup>I-labelled insulin-like growth factor-1, <sup>125</sup>I-labelled follicle-stimulating hormone, and <sup>125</sup>I-labelled human chorionic gonadotropin binding sites in ovaries from bovine fetuses

and neonatal calves. *Biology of Reproduction* v.47, p.814–822, 1992.

- WEBB, R.; CAMPBELL, B.K.; GARVERICK, H.A.; GONG, J.G.; GUTIERREZ, C.G.; ARMSTRONG, D.G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Reproduction in Domestic Ruminants IV. Journal of Reproduction and Fertility Supplement* v.54, p.33–48, 1999a.
- WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*, v.82, p.63–74, 2004.
- WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ROBINSON, R.S.; WATHES, D.C. Consequences for reproductive function of metabolic adaptation to load Metabolic stress in dairy cows. Pages 99–112 in *Occasional Publication No. 24. British Society of Animal Science, Pencaitland, U.K.*, 1999c.
- WEBB, R.; GOSDEN, R.G.; TELFER, E.E.; MOOR, R.M. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Anim. Sci. (Pencaitland)* v.68, p.257–284, 1999b.
- WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; GUTIERREZ, C.G.; GARVERICK, H.A.; ARMSTRONG, D.G. Mechanism regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction in Domestic Ruminants V. Reproduction Supplement* v.61, p.71–90, 2003.
- WHISNANT, C.S.; KISER, T.E.; THOMPSON, F.N.; BARB, C.R. Influence of calf removal on the serum luteinising hormone response to naloxone in the post-partum beef cow. *Journal of Animal Science* v.63, p.561–564, 1986a.
- WHISNANT, C.S.; THOMPSON, F.N.; KISER, T.E.; BARB, C.R. Effect of naloxone on serum luteinising hormone, cortisol, and prolactin concentrations in anoestrous beef cows. *Journal of Animal Science* v.62, p.1340–1345, 1986b.
- WILLIAMS, A.H. Long term effects of nutrition of ewe lambs in the neonatal period. In: Lindsay, D.R., Pearce, D.T. (Eds.), *Reproduction in Sheep*. Australian Academic Science and Australian Wool Corporation, Canberra, p.272–273, 1984.
- WILLIAMS, G.L.; AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R.; STANKO, R.L.; NIZIELSKI, S.E.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Domestic Animals Endocrinology* v.23, p.339–349, 2002.
- WILLIAMS, L.M.; ADAM, C.L.; MERCER, J.G.; MOAR, K.M.; SLATER, D.; HUNTER, L.; FINDLAY, P.A.; HOGGARD, N. Leptin receptor and neuropeptide Y gene expression in the sheep brain. *Journal of Neuroendocrinology* V.11, p.165–169, 1999.

- WILSON, M.E. IGF-I administration advances the decrease in hypersensitivity to oestradiol negative feedback inhibition of serum LH in adolescent female rhesus monkeys. *Journal of Endocrinology* v.145, p.121–130, 1995.
- WOLFE, M.W.; STUMPF, T.T.; ROBERSON, M.S.; WOLFE, P.L.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Opioid and 17 $\beta$ -oestradiol regulation of LH and FSH secretion during sexual maturation in heifers. *Domestic Animals Endocrinology* v.8, p.491–498, 1989.
- WRENZYCKI, C.; DE SOUSA, P.; HERMANN, D.; WATSON, A. J.; NIEMANN, H.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M. P. Effect of diet type and quantity fed during superovulation on the relative abundance of mRNA in bovine embryos. *Theriogenology*, v.51, p.195, (abstract) 1999.
- WYLLIE, A.R.G.; MACKEY, D.R.; DELVIN, D.; BJOURSON, A.J.; DISKIN, M.G. Plasma leptin in intact and ovarioectomised beef heifers on low and high planes of nutrition. In: *Proceedings of the Agricultural Research Forum*. Tullamore, Ireland, 3–4 September 2001, p. 43, 2001.
- YAAKUB H, O'CAKGHAN D, BOLAND MP. Effect of roughage type and concentrate supplementation on follicle numbers and in vitro fertilization and development of oocytes recovered from beef heifers. *Animal Reproduction Science* v.55, p.1-12, 1999.
- YAAKUB, H.; O'CALLAGHAN, D.; DUFFY, P.; DUBY, R. T.; BOLAND, M. P. Effect of concentrate type and quality on superovulation in cattle. *Proceedings of Techniques for Gamete Manipulation and Storage*. Hamilton, New Zealand, p.37, 1996.
- YELICH, J.V.; WETTEMANN, R.P.; MARSTON, T.T.; SPICER, L.J. Luteinising hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Domestic Animals Endocrinology* v.13, p.325–338, 1996.
- YUAN, W.; BAO, B.; GARVERICK, H.A.; YOUNGQUIST, R.S.; LUCY, M.C. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Domestic Animals Endocrinology* v.15, p.55–63, 1998.
- ZI, X-D. Reproduction in female yaks (*Bos grunniens*) and opportunities for improvement. *Theriogenology*, v.59, p.1303–1312, 2003.

## **11. ANEXOS**

### **ANEXO 1**

#### **Utilização da insulina em cabras da raça Moxotó submetidas a um tratamento de superovulação**

*(Use of the insulin in Moxotó goats submitted to an superovulation treatment)*

## **Utilização da insulina em cabras da raça Moxotó submetidas a um tratamento de superovulação**

---

Anderson Pinto **ALMEIDA**; Aline Lima de SOUZA; Isadora Machado Teixeira LIMA; Deborah de Melo MAGALHÃES; João Davi Araújo da SILVA; Karlliely de Castro ALMEIDA; Elizabeth Saraiva Peixoto PINHEIRO; Raylene Ramos MOURA; Alice ANDRIOLI; Vicente José de Figueirêdo FREITAS; Davide RONDINA.

### **RESUMO**

A disponibilidade de nutrientes é um fator modulador da atividade reprodutiva. A quantidade de energia é regulada através do fluxo de glicose mediado pela insulina. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a utilização da insulina para estimulação e manutenção do nível energético, proporcionando um melhor desempenho reprodutivo em cabras nativas. Foram utilizadas 12 fêmeas caprinas da raça Moxotó, com alimentação correspondente a 1,5 vezes o requerimento de manutenção. Estas foram divididas em dois grupos: Controle (n=5), onde a alimentação foi mantida e, Insulina (n=7), no qual foram administradas 3 doses de insulina (0,2 UI / kg de PV / dia) além da alimentação, paralelamente ao protocolo de superovulação. O tratamento superovulatório consistiu em seis aplicações decrescentes de pFSH (120 mg), associado ao uso de esponjas vaginais por 11 dias. As detecções de estro iniciaram-se oito dias após a remoção da esponja, sendo realizado procedimento de laparoscopia para avaliação da resposta ovariana. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação ao número de animais em estro e respondendo ao tratamento superovulatório. O grupo Insulina foi significativamente superior ao grupo Controle no total de ovulações (83 vs. 58, P<0,05). A administração de insulina mostrou-se um método eficiente para aumentar a resposta ovulatória de cabras da raça moxotó em um tratamento de sincronização do estro e superovulação.

Palavras-chave: cabras, insulina, superovulação, resposta ovariana.

## ABSTRACT

### USE OF THE INSULIN IN MOXOTÓ GOATS SUBMITTED TO AN SUPEROVULATION TREATMENT

The availability of nutrients is a factor modulator of the reproductive activity. The amount of energy is regulated through the glucose flow mediated by the insulin. Like this, this work had for objective to evaluate the use of the insulin for stimulation and maintenance of the energy level, providing a better reproductive acting in native goats. 12 goats of the Moxotó breed were used, with feeding corresponding to 1.5 times the maintenance requirement. These were divided in two groups: Control ( $n=5$ ), where the feeding was maintained and, Insulin ( $n=7$ ), in which were administered 3 insulin doses (0,2 UI / kg of PV / day) besides the feeding, parallel to the superovulation protocol. The superovulatory treatment consisted of six decreasing applications of pFSH (120 mg), associated to the use of vaginal sponge for 11 days. The estrous detections began eight days after the removal of the sponge, being accomplished laparoscopy procedure for evaluation of the ovarian answer. Significant differences were not observed among the groups in relation to the number of animals in estrous and responding to the superovulatory treatment. The Insulin group was superior significantly to the Control group in the total of ovulations (83 vs. 58,  $P < 0.05$ ). The insulin administration an efficient method was shown to increase the ovulatory response of goats of the Moxotó breed in a treatment of estrous synchronization and superovulation.

Keywords: goats, insulin, superovulation, ovarian response.

## INTRODUÇÃO

É conhecido que a disponibilidade de nutrientes é um fator regulador da atividade reprodutiva, sendo o potencial reprodutivo das espécies domésticas, entre elas a caprina, influenciado pelos efeitos nutricionais a curto e longo prazo. Sabe-se também da influência da nutrição sobre os processos de gametogênese e recrutamento folicular (Boland *et al.*, 2001). Ovelhas submetidas a infusão de glicose (Downing *et al.*, 1995) têm elevada sua taxa de ovulação como resultado da disponibilidade de energia, sendo os efeitos nutricionais na taxa de ovulação regulados através do fluxo de glicose mediado pela insulina.

A exploração do rebanho caprino no Nordeste do Brasil é caracterizada por baixos níveis de produção e reprodução. O manejo nutricional é dependente, sobretudo, da

variação quantitativa e qualitativa da vegetação natural ao longo do ano. Por estas razões, é escassa a utilização das biotécnicas reprodutivas como forma de aumentar a produtividade. Para o produtor, se torna fundamental a disponibilidade e o custo da suplementação alimentar durante o ano, sobretudo na estação seca. Nesse sentido, é importante o desenvolvimento de um protocolo simples e eficiente de estimulação energética a fim de maximizar a resposta ovulatória e a conseqüente produção de embriões *in vivo* em cabras nativas.

Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar a utilização da insulina para estimulação e manutenção do nível energético, proporcionando uma melhor resposta a um tratamento padrão de superovulação.

#### MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (UECE) em Fortaleza, Ceará, localizada a 3°43' S e 38°30' O. Para este estudo foram utilizadas 12 fêmeas caprinas da raça Moxotó oriundas da Embrapa Caprinos (Sobral-CE), adultas ( $3,6 \pm 0,7$  anos), pluríparas e de peso médio de  $27,5 \pm 4,0$  kg.

Os animais foram mantidos em um sistema de manejo semi-intensivo, onde pela manhã ficavam em área de exercício ao redor de um aprisco suspenso e, à tarde, eram alojados em boxes cobertos, contendo comedouros, com acesso livre à água e ao sal mineral. As cabras foram submetidas a um período pré-experimental mínimo de 15 dias, visando estabelecer uma hierarquia e a sua adaptação às condições de manejo. Os animais receberam feno de Tifton (*Cynodon dactylon*) *ad libitum* e concentrado contendo 19% de proteína bruta em quantidade a fornecer um nível nutricional correspondente a 1,5 vezes o requerimento energético e protéico de manutenção (AFRC, 1988).

Após o período pré-experimental, as cabras foram selecionadas aleatoriamente e divididas em dois grupos, um Controle ( $n = 5$ ), onde foi mantido o nível nutricional e um Insulina ( $n = 7$ ) que receberam, além da alimentação, insulina.

O estro dos animais foi sincronizado com esponjas vaginais contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon®, Syntex, Argentina) inserida por 11 dias, com aplicação de 50 $\mu$ g de D-Cloprostenol (Ciosin, Schering-Plough-Coopers, Brasil) por via intramuscular quarenta e oito horas antes da retirada do progestágeno e iniciado o tratamento superovulatório, que consistiu de seis aplicações de pFSH (Folltropin®, Vetrepharm, Canadá), em doses decrescentes, com intervalos de 12 h, perfazendo uma dose total de 120 mg (30/30, 15/15 e 15/15 mg), sendo feita a administração de insulina (0,2 UI / kg de PV / dia) nos animais do grupo correspondente, por via sub-cutânea,

concomitante à primeira, terceira e quinta aplicação de pFSH. As esponjas foram removidas no momento da quinta dose de pFSH, sendo então, 12 h após, as cabras submetidas à detecção do estro em intervalos de quatro horas. Oito dias após a remoção da esponja, as cabras foram sujeitas a procedimento de laparoscopia para avaliação da resposta ovariana.

Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) onde o fator testado foi o grupo, sendo as comparações entre os números de ovulações e os números totais de folículos executadas pelo teste do Qui-quadrado e expressos com valor  $\pm$  desvio padrão. O nível de significância utilizado foi de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Número total de folículos de 2 a 5mm observados em cabras da raça Moxotó recebendo ou não insulina durante um tratamento de superovulação.

Tratamento	N*	Folículos			
		2 mm	3 mm	4 mm	5 mm
Insulina	5	38	14	5	9
Controle	3	4	13	9	3

N\*: número de animais responsivos ao tratamento superovulatório.

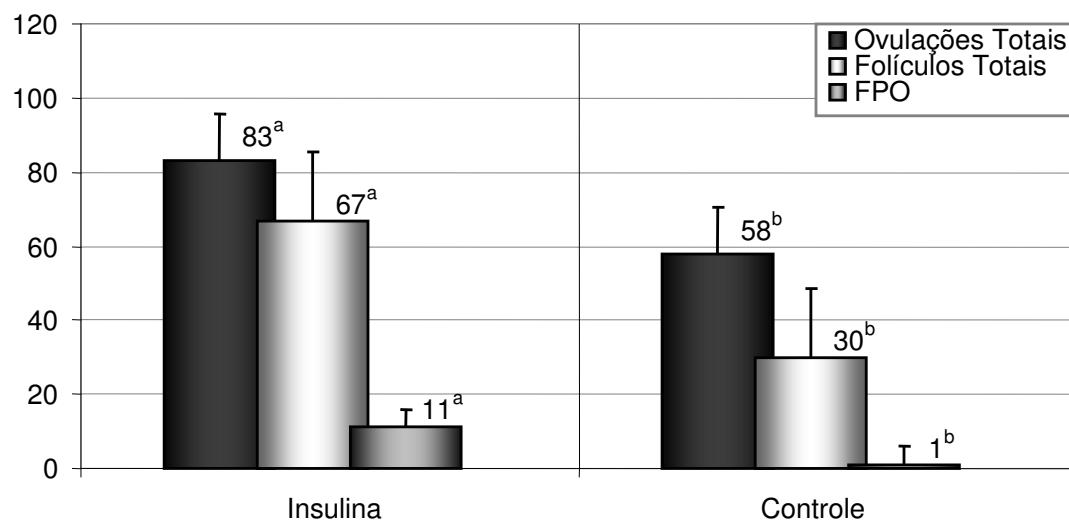


Figura 01. Número total de ovulações, folículos totais (2 a 5 mm) e folículos pré-ovulatórios (FPO) observados em cabras da raça Moxotó recebendo ou não insulina durante um tratamento de superovulação.

<sup>a,b</sup> Sobreescritos diferentes diferem significativamente ( $P<0,05$ ).

No que se refere ao número de animais que exibiram comportamento de estro, o grupo Insulina apresentou resultado semelhante ao grupo Controle, 71,4% (5/7) e 60% (3/5), respectivamente. No grupo Insulina houve uma tendência a um maior percentual de animais em estro que no grupo Controle, o que pode evidenciar um efeito positivo da administração de insulina, como forma de aumentar o aporte energético durante o ciclo reprodutivo. Resultado semelhante foi encontrado por Mani *et al* (1992), comparando caprinos alimentados com dietas de diferentes níveis nutricionais, que demonstraram que, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, animais submetidos a dieta de manutenção tendem a ter suas taxas de animais apresentando estro superiores àquelas observadas em animais sujeitos a restrição alimentar (87,5% e 71,0%, respectivamente).

Foram considerados responsivos ao tratamento aqueles animais que apresentassem pelo menos 5 corpos lúteos em ambos os ovários, sendo observado valores semelhantes entre os grupos Insulina e Controle, com 71,4% e 60%, respectivamente, o que está semelhante aos resultados obtidos por Selvaraju *et al.* (2003) que obtiveram uma resposta média de 73,3% de animais responsivos ao tratamento superovulatório.

O número total de ovulações indicou um efeito significativo ( $P<0,05$ ) do tratamento com Insulina em relação ao grupo Controle (Figura 1,  $P<0,05$ ). Este fato também ficou evidente no número total folículos (2 a 5mm) (Tabela 1) e no número de folículos pré-ovulatórios. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Selvaraju *et al.* (2003), estudando a resposta ovariana de cabras tratadas com insulina, onde observaram que há um aumento significativo na taxa de ovulação quando administrada insulina antes início do tratamento superovulatório, o que pode resultar de uma alteração da dinâmica folicular causada pela insulina, através de um aumento do recrutamento folicular, bem como de uma diminuição do número de folículos que entram em processo de atresia.

O status energético pode ser considerado o principal fator que influencia os processos reprodutivos. Downing *et al.* (1995), avaliando a infusão de glicose em ovelhas, observaram um aumento na taxa de ovulação, como resultado de uma ação direta da disponibilidade da glicose, mediada pela insulina, e também um aumento das concentrações de FSH durante a fase folicular, o que reflete positivamente sobre o número de folículos recrutados. Rhind e McNeilly (1998), observaram que ovelhas submetidas a dietas de elevada ingestão tiveram um número significativamente superior de folículos de 1 mm quando comparadas a animais com dieta restrita, o que poderia ser atribuído a um aumento da resposta ovariana às gonadotrofinas circulantes, hormônios metabólicos e fatores de crescimento.

Aumentos na taxas de ovulação estão diretamente relacionados com a disponibilidade de energia (Boland *et al.*, 2001). Como ambos os grupos apresentaram resultados semelhantes em relação ao número de animais demonstrando estro e número de animais responsivos ao tratamento, os resultados superiores observados no grupo Insulina em relação ao total de ovulações pode ser atribuído à ação da insulina, como mediador da absorção de glicose, levando a um aumento na disponibilidade de energia, o que refletiu positivamente sobre o processo de ovulação.

## CONCLUSÃO

A administração de insulina mostrou-se um método eficiente de aumentar a resposta ovulatória de cabras da raça Moxotó durante um tratamento de sincronização do estro e superovulação.

## REFERÊNCIAS

- AFRC. The nutrition of goats. CAB International, 118pp, 1998.
- BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. Theriogenology, 55, 1323-1340, 2001.
- DOWNING, J.A.; JOSS, J.; CONNELL, P.; SCARAMUZZI, R.J. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrus cycle. Journal of Endocrinology, 146: 403-410, 1995.
- MANI, A.U.; MCKELVEY, W.A.C.; WATSON, E.D. The effects of low leve of feeding on response to synchronization of estrous, ovulation rate and embryo loss in goats. Theriogenology, 38: 1013-1022, 1992.
- RHIND, S.M.; MACNEILLY, A.S. Effects of level of food intake on ovarian follicle number, size and steroidogenic capacity in the ewe. Animal Reproducion Science, 52: 131-138, 1998.
- SELVARAJU, S.; AGARWAL, S. K.; KARCHE, S. D.; MAJUMDAR A. C. Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats treated with insulin. Theriogenology, 59: 1459-1468, 2003.



Prezado(a) Anderson Pinto Almeida,

Temos a satisfação de informar que seu trabalho "1252 - UTILIZAÇÃO DA INSULINA EM CABRAS DA RAÇA MOXOTÓ SUBMETIDAS A UM TRATAMENTO DE SUPEROVULAÇÃO" foi aceito para publicação na 43ª Reunião da SBZ - <http://www.reuniaoanualsbz.com.br>.

Além de ser apresentado durante o Congresso, o referido trabalho será publicado nos Anais da 43ª Reunião da SBZ(CD-ROM).

Reinteramos nosso agradecemos pelo seu interesse em participar da 43ª Reunião da SBZ.  
Gratamente,

Comissão Científica - 43ª Reunião da SBZ  
Centro de Ciências Agrárias  
Campus II da UFPB  
CEP 58397-000  
Areia - PB

FONE:  
(0xx83) 3362-2300  
Ramal 241  
ou Ramal 219

FONE/FAX:  
(0xx83) 3362-1010

E-MAIL:  
[secretariasbz2006@cca.ufpb.br](mailto:secretariasbz2006@cca.ufpb.br)

## **ANEXO 2**

### **Ovulatory Response to Superovulation Treatment in Goats with Stimulated Energy Balance**

Elsevier Editorial System(tm) for Animal Reproduction Science

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Ovulatory Response to Superovulation Treatment in Goats with Stimulated Energy Balance

Article Type: Research Paper

Section/Category:

Keywords: Goat; nutrition; indigenous breed; ovarian response; energy balance

Corresponding Author: Mr Anderson Pinto Almeida, JD

Corresponding Author's Institution: State University of Ceará

First Author: Anderson Pinto Almeida, JD

Order of Authors: Anderson Pinto Almeida, JD; Aline L. Souza, JD; Giovanna

Galeati, PhD; Edilson S. Lopes-Junior, PhD; Nadia Govoni, PhD; Vicente J.F.

Freitas, PhD; Davide Rondina, PhD

Manuscript Region of Origin:

Abstract:

# Ovulatory Response to Superovulation Treatment in Goats with Stimulated Energy Balance

**Almeida, A.P.<sup>1</sup>, Souza, A.L.<sup>1</sup>, Galeati G.<sup>2</sup>, Lopes-Junior E.S.<sup>1</sup>, Govoni N..<sup>2</sup>, Freitas V.J.F.<sup>1</sup>, Rondina D.<sup>1a</sup>**

<sup>1</sup>\* Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil;

<sup>2</sup> Facoltà di Veterinaria, Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy

\* Institute where the work was conducted.

**Author's address (for correspondence):** Prof. Davide Rondina

Universidade Estadual do Ceará – Faculdade de Veterinária.

Av. Paranjana, 1700. Campus do Itaperi, 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil

Tel: +55-85-31019858 Fax: +55-85-31019840.

E-mail: [davide@uece.br](mailto:davide@uece.br)

## Abstract

To compare superovulation response in goats with stimulated energy balance, seventeen adult Moxoto goats were submitted to synchronization/superovulation treatment using 60mg MPA vaginal sponge for 11 days plus 50µg cloprostenol 48 h prior to sponge removal and 120 mg pFSH at 9, 10 and 11 days. The goats were allocated in three groups: Feed (n = 5): diet with 150% maintenance (1.5 x M); Propylene (n = 5): diet with 1.5 x M plus administration of 80 mL/goat/d of propylene glycol during the hormonal procedure; Insulin (n = 7): diet with 1.5 x M plus three injections of insulin (0.2UI/kg BW/d) day 9, 10 and 11, at FSH treatment. From sponge insertion every three days and from estrus onset, during 24 h at 4 h interval, blood samples were collected for insulin and estradiol assays. Ovulation was verified by laparoscopy eight days after sponge removal. Insulin rates in goats treated with propylene glycol were similar to the Insulin group ( $P > 0.05$ ) and both were higher than the supplemented goats ( $P < 0.05$ ). In the Insulin and Feed groups, estrus concentration was superior than with propylene glycol treatment ( $P < 0.05$ ). Although the number of animals that ovulated was similar between groups, the goats treated with insulin showed a higher number of follicles and corpus luteum (CL) ( $P < 0.05$ ). In this group, the amount of estradiol was correlated with the number of CL ( $r = 0.84$ ,  $P < 0.05$ ). In conclusion, treatment with insulin was shown to be more efficient in the ovulatory response and more practical for use in the field.

Keywords: Goat; nutrition; indigenous breed; ovarian response; energy balance.

## **Introduction**

Energy balance is an essential condition in assisted reproduction technologies when used to support conservation programs of genetic domestic animal resources. Especially in tropical arid areas, the main drawback of goat husbandry continues to be how to sustain the nutritional status during the prolonged seasonal food shortage. In such regions, the low body condition of females associated with the restricted number of animals in small indigenous populations, suggests a maximization of the reproductive responses by increasing nutrient uptake at the ovary.

In goats, as well as other ruminants, insulin is a recognized signal for mediating changes of nutrient intake and follicular dynamics. In goats, after superovulation treatment, the ovarian response was enhanced by insulin injections (Selvaraju et al., 2003), or by increased dietary intake in heifers (Gong et al., 2002). Hidalgo et al. (2004) utilizing propylene glycol for a brief period, increased pregnancy rates in recipient heifers after embryo transfer. Insulinaemia is commonly improved by administration of propylene glycol in cows (Miyoshi et al., 2001) or sheep (Chiofalo et al., 2005) during post-partum.

Although several forms of energy manipulation have been described in literature, very little is known—especially in goats—concerning which procedure provides the best stimulation at the ovary level. Thus, the aim of this study was to compare the ovulatory response after superovulation treatment in goats with energy balance stimulated by different protocols.

## **Materials and Methods**

### *Animals and Location*

The experiment was conducted at the State University of Ceará, located at 3°43' S and 38°30' W. For this study, seventeen multiparous adult, non-pregnant and non-lactating Moxoto goats with mean  $\pm$  SEM live weight of  $26.60 \pm 4.08$  kg and age ( $3.29 \pm 0.69$  years) were used. The animals used in this study are part of an indigenous breed conservation program carried out *in situ* by Embrapa Caprinos (Embrapa Caprinos – Sobral, Ceará).

### *Experimental Design*

The experimental design is summarized in Figure 1.

The goats were maintained under semi-intensive management; they were kept in an open pen from 08:00 to 16:00 h, and later were housed in boxes at ground level. All animals were submitted to 15 days of housing and hierachic adaptation and were fed with Bermuda hay plus concentrate to provide 150% of energy requirements for maintenance of

live weight (1.5 x M; AFRC, 1998). The goats had free access to water and mineral salt. All females were submitted to an estrus synchronization treatment using vaginal sponges impregnated with 60 mg MPA (Progespon®, Syntex, Argentina) for 11 days and 50 µg cloprostenol (Ciosin®, Coopers, Brazil), 48 h prior to sponge removal. During days 9 to 11, goats were superovulated using 120 mg pFSH (Folltropin®, Vetrepharm, Canada) administrated intramuscularly at 12 h intervals in decreasing doses (30/30, 15/15 and 15/15 mg). Sponges were removed at the fifth pFSH dose.

The goats were allocated in three energy treatments. Feed group ( $n = 5$ ): diet with 1.5 x M; Propylene ( $n = 5$ ): diet with 1.5 x M plus administration of 80 mL/goat/day of propylene glycol during the hormonal procedure; and Insulin ( $n = 7$ ): diet with 1.5 x M plus three injections of insulin (0.2UI/kg BW/day) at day 9, 10 and 11, at the same time as the FSH injections. The ovarian response was verified by laparoscopy performed eight days after sponge removal. Goats showing five or more corpora lutea (CL) were considered as responsive to superovulation treatment.

#### *Hormone Assays*

From sponge insertion every three days and from estrus onset, during 24 h at 4 h intervals, before feeding, blood samples were collected in heparinized tubes by venipuncture. From plasma,  $17\beta$ -estradiol was measured as described by Tamanini et al. (1985) and insulin was determined using an RIA kit (Insulin: Medical Systems, Genova).

#### *Statistical Analysis*

The effect of energy protocols (Feed, Propylene glycol, Insulin) was analyzed by the SAS GLM procedure (SAS, Inc., USA). Comparison between means of nutritional treatment was performed by the Duncan test. Differences among proportions or numbers were analyzed by Chi Square. Correlation test was assessed using the Spearman test. Values were expressed as mean  $\pm$  SEM.

## **Results**

During the experimental period, insulin concentrations (Table 1) in the Feed group showed significantly lower values ( $P < 0.05$ ) when compared to the other energy treatments. A similar result was found in ovulating goats when the insulin profile was measured throughout 24 hours following the onset of estrus (Figure 3). In this interval, the mean insulin level in goats treated with propylene glycol ( $13.12 \pm 0.49 \mu\text{U/mL}$ ) was

similar to the Insulin group ( $14.61 \pm 0.48 \mu\text{U/mL}$ ) ( $P > 0.05$ ), and both were higher than the supplemented goats ( $9.68 \pm 0.43 \mu\text{U/mL}$ ) ( $P < 0.05$ ).

Two goats from each group did not exhibit estrus and ovulation after synchronization/superovulation treatment, except in the Feed group where one animal of two presented a unique CL (Table 1).

The interval between the sponge removal and estrus onset (Table 1) was not significantly different between groups ( $P < 0.05$ ) showing a mean of  $29.45 \pm 2.11$  hours. By contrast, in the Propylene group, the interval between first and last estrus occurrence was higher than with the Insulin group ( $P < 0.05$ ) (Table 1). In the Propylene group, estrus was distributed from 20 to 40 hours after the sponge removal (Figure 2).

The estradiol pattern measured in the 72 hours after estrus is given in Figure 3. No difference was found in the treatments regarding the number of animals ovulating and for the goats that presented more than five CL (Table 1). At laparoscopy in the Insulin group, a higher number of follicles and CL ( $P < 0.05$ ) was counted. In this treatment, the amount of estradiol was correlated with the number of corpus luteum ( $r = 0.84$ ,  $P < 0.05$ ). Ovulatory rate was  $10.25 \pm 1.67$ ,  $19.00 \pm 1.15$  and  $16.60 \pm 1.96$ , respectively, for the Propylene, Insulin and Feed groups.

## Discussion

The results obtained in the present study have shown that it is possible to stimulate the energy balance in the short term, inducing a significant response to superovulatory treatment in goats.

The reproductive response in ruminants is directly related to the availability of energy at the ovary level, which in turn is related to the control of the anabolic and catabolic processes controlled by insulin (Monget and Martins, 1997). Variations of the peripheral concentrations of insulin at short time intervals can be achieved by means of insulin infusions (Downing and Scaramuzzi, 1997) or through the ruminal absorption of propionate by increasing feed consumption (Gong et al., 2002) or the administration of precursors such as propylene glycol (Sauer et al., 1973).

In our experiment, despite the differences in plasma insulin concentrations observed among these three types of energy treatments, the profiles recorded throughout the experiment consistently presented values according to those proposed by other authors utilizing well-fed goats (Khan and Ludri, 2002; Rondina et al., 2005).

Regarding the reproductive parameters, the data demonstrate that insulinemia did not act upon the number of animals in estrus nor the interval between sponge removal and

estrus onset, regardless of the group studied. This result was expected due to the feeding level maintained throughout the experiment. For ruminants, different authors have verified that a greater estrus response can be obtained in consequence of improvements to body condition (Lassoued et al., 2004; Paula et al., 2005). However, considering the animals with similar levels of insulinemia (Propylene and Insulin groups), a difference was verified regarding the frequency and distribution of estrus onset. The more concentrated distribution of goats in estrus in the Insulin group may be due to an effect related to the timing of insulin application, i.e., in a period that is short and close to estrus, resulting in a more immediate response to the stimulus.

The ovulation rate observed in the experiment was similar to that observed in goats superovulated with eCG or FSH (Armstrong et al., 1982; Pendleton et al., 1992). The response to the superovulatory treatment ( $\geq 5$  CL/animal) was observed in the three experimental groups, with no differences between the groups. These values are similar to those obtained by Selvaraju et al. (2003), that obtained a mean response of 73.3% of insulin-treated mixed-breed goats responsive to superovulatory treatment.

The best overall ovarian response (follicle and CL) in the Insulin group cannot be explained by effects linked to insulinemia, likewise to a possible synergic effect between such insulinemia and the hormonal stimulation produced by the superovulatory treatment simultaneous to follicular recruitment during the follicular wave. Selvaraju et al., (2003) observed an increase in the number of follicles and ovulations, attributing this result to a decrease in the number of follicles that enter the process of atresia.

Energy status can be considered the primary factor that influences the reproductive processes. Downing et al. (1995), evaluating glucose infusion in sheep, observed an increase in the ovulation rate as a result of a direct action of the availability of glucose, mediated by insulin, as well as an increase in FSH concentrations during the follicular phase, which can cause an increase in the number of follicles recruited. Rhind and McNeilly (1998), observed that sheep submitted to high-feed diets had a significantly greater number of 1-mm follicles when compared to animals on restricted diets, which may be attributed to an increase in the ovarian response to the circulating gonadotropins, metabolic hormones, and growth factors.

The variability of the ovulatory response of donors after gonadotropic treatment exists in small ruminants; it is more important in sheep than in goats. After FSH treatment for the induction of superovulation, nearly 25% of Lacaune breed diary sheep present less than five ovulations, vis-à-vis only 10% in Alpine and Saanen breed goats (Baril et al., 1989). Therefore, this variability is already expected in small ruminants. Furthermore,

progestagen has been identified as a cause of this variation due to systemic factors such as the LH profile, or to the ovarian level, follicular growth profile and dominance (Leyva et al., 1998).

Breed has also been identified as a factor that can contribute to the variability of the ovulatory response (Bindon et al., 1986). In general, prolific ovine breeds present better ovulatory responses to the exogenous gonadotropin stimulus (Dufour et al., 2000). However, in caprine breeds, the natural prolificacy of the particular breed appears not to be determining factor for this response (Kiessling et al., 1986).

Baldassarre et al., 2004, in a study on small-scale BELE® breed goats, adopted a total dosage of 133 mg of pFSH, obtaining an ovulation rate response of 12.4 to 12.9 ovulations per donor.

### **Conclusion**

The results show how the injection of insulin at the moment of superovulatory treatment brought about a greater synergic effect at the ovary level, causing an increase in the availability of energy, which reflected positively upon the synchronization of the expression of estrus, follicular recruitment, and the ovulation process.

Additionally, the use of insulin as strategy for stimulating the energy balance was shown as a more economical and practical approach compared to propylene glycol, since the latter demands daily applications, while the former restricts the application of the technique to a limited time interval, with less interference in the animal management system.

### **Acknowledgements**

A.P. Almeida and A.L. Souza were the recipients of a scholarship from CAPES/Brazil. The authors would like to thank Embrapa Caprinos for the session of animals used in this study. The work was financed by FUNDECI-BNB (Brazil). V.J.F. Freitas is senior investigator of CNPq/Brazil

## References

- AFRC. The nutrition of goats. CAB International, 118pp, 1998.
- Armstrong, D. T., Pfitzner, A. P., Seemark, R. F., 1982. Ovarian responses and embryo survival in goats following superovulation and embryo transfer. *Theriogenology*, 17, 76.
- Baldassarre, H., Wang, B., Gauthier, M., Neveu, N., Lazaris, A., Karatzas, C. N., 2004. Effect of GnRH injection timing in the production of pronuclear-stage zygotes used for DNA microinjection. *Zygote* 12, 257–261.
- Baril, G., Casamitjana, P., Perrin, J., Vallet, J. C., 1989. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *Zuchthyg.* 24, 101-115.
- Bindon, B. M., Piper, L. R., Cahill, L. P., Driancourt, M. A., O’Shea, T., 1986. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology*, 25, 53-70.
- Chiofalo, V., Todaro, M., Liotta, L., Margiotta, S., T. Manzo, G., 2005. Effect of Propylene Glycol on Pre- and Postpartum Performance by Dairy Ewes. *Small Ruminant Research* 58, 107-114.
- Downing, J. A., Scaramuzzi, R. J., 1997. The effect of infusion of insulin during the luteal phase of the estrous cycle on the ovulation rate and on plasma concentrations of LH, FHS and glucose in ewes. *Theriogenology*, 47, 747-759.
- Downing, J. A., Joss, J., Connell, P., Scaramuzzi, R. J., 1995. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrus cycle. *Journal of Endocrinology*, 146, 403-410.
- Dufour, J. J., Cognié, Y, Mermilliod, P., Mariana, J-C., Romain, R. F., 2000. Effects of the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118, 85–94.
- Gong, J. G., Armstrong, D. G., Baxter, G., Hogg, C. O., Garnsworthy, P. C., Webb, R., 2002. The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology* 57, 1591–1602.

Hidalgo, C. O., Gómez, E., Prieto, L., Duque, P., Goyache, F., Fernández, L., Fernández, I., Facal, N., Díez, C., 2004. Pregnancy rates and metabolic profiles in cattle treated with propylene glycol prior to embryo transfer. *Theriogenology*, 62, 664–676.

Khan, J. R., Ludri, R. S., 2002. Hormone profile of crossbred goats during the periparturient period. *Tropical Animal Health and Production*, 34, 51-162.

Kiessling, A. A., Hughes, W. H., Blankevoort, M. R., 1986. Superovulation and embryo transfer in the dairy goat. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 188 829-832.

Lassoued, N., Rekik, M., Mahouachi, M., Ben Hamouda, M., 2004. The effect of nutrition prior to and during mating on ovulation rate, reproductive wastage, and lambing rate in three sheep breeds. *Small Ruminant Research*, 52, 117–125.

Leyva, V., Buckrell, B. C., Walton, J. S., 1998. Follicular activity and ovulation regulated by exogenous progestagen and PMSG in anestrous ewes. *Theriogenology*, 50, 377-393.

Miyoshi, S., Pate, J. L., Palmquist, D. L, 2001. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, 68, 2, 29-43.

Monget, P.; MARTIN, G.B. Involvement of insulin-like growth factor in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Human Reproduction*, v.12, p.33-52, 1997.

Paula, N. R. O., Galeati, G., Teixeira, D. I. A., Lopes-Júnior, E. S., Freitas, V. J. F., Rondina, D., 2005. Responsiveness to progestagen-eCG-cloprostenol treatment in goat food restricted for long period and refed. *Reproduction in Domestic Animals*, 40, 1-3.

Pendleton, R. J., Youngs, C. R., Rorie, R. W., Pool, S. H., Memon, M. A., Godke, R. A., 1992. Comparison of fluorogestone acetate sponges with norgestomet implants for induction of estrus and ovulation in anestrous dairy goats. *Small Ruminant Research* 8, 269-273.

Rhind, S. M., Macneilly, A. S., 1998. Effects of level of food intake on ovarian follicle number, size and steroidogenic capacity in the ewe. Animal Reproduction Science, 52, 131-138.

Rondina, D., Freitas, V. J. F., Amorim, C. A., Mafucci, A., Conti, S., Cecchi, R., Paula, N. R. O., Martini, A., 2005. Preantral follicular development in massese lambs born in two seasons of the year. Small Ruminant Research, Amsterdam, 57, 277-280.

Sauer, F. D., Erfle, J. D., Fisher, L. J., 1973. Propylene glycol and glycerol as a feed additive for lactating dairy cows: an evaluation of blood metabolite parameters. Can. Journal of Animal Science 53, 265-271.

Selvaraju, S., Agarwal, S. K., Karche, S. D., Majumdar A. C., 2003. Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats treated with insulin. Theriogenology, 59, 1459-1468.

Tamanini, C., Bono, G., Cairoli, F., Chiesa, F., 1985. Endocrine responses induced in anestrous goats by the administration of different hormones after a fluorogestone acetate treatment. Animal Reproduction Science, 9, 357-364.

## List of Figures

**Fig. 1:** Experimental design. Synchronization and superovulation treatment day 0 sponge insertion (SI) and start of nutrient treatment, day 9 PGF<sub>2α</sub> administration, day 9 – 11 FSH treatment (pFSH), day 11 sponge removal (SR). After a further 8-day period, day 18 laparoscopy (Lap). Feed: diet with 1.5 x maintenance of energy requirements; Propylene: diet with 1.5 x M plus administration of 80 mL/goat/d of propylene glycol during the hormonal procedure; Insulin (n = 7): diet with 1.5 x M plus three injections of insulin (0.2UI/kg BW/d) day 9, 10 and 11, in correspondence with FSH treatment.

**Fig. 2:** Cumulative distribution of goats in oestrus according to interval (h) between sponge removal (SR) and onset of estrus (OE).

**Fig. 3:** Estradiol and insulin levels according to the time of oestrus onset in ovulating goats with different energy protocols. In the figure, insulin values are given as means ± SEM

## List of Tables

**Table 1.** Estrus, ovarian and hormonal responses in goats with different energy protocols. Values are given in means ± SEM.

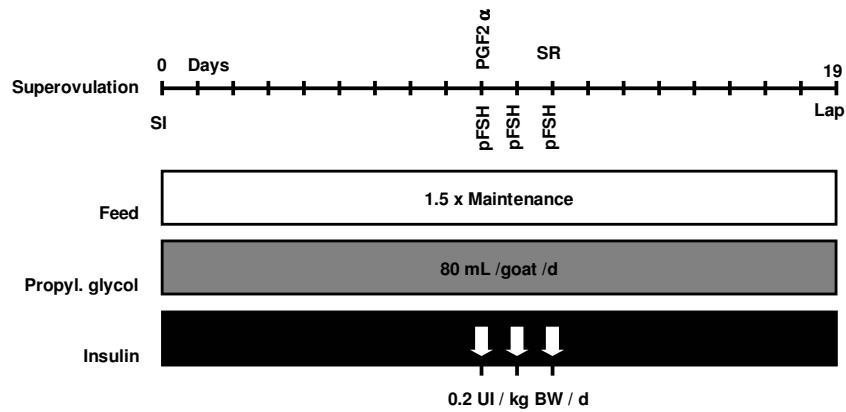


Figure 1: Experimental design. Hormonal treatment for synchronization/superovulation:  
 day 0 = sponge insertion (SI) and start of nutrient treatments, day 9 = PGF<sub>2α</sub> injection,  
 day 9 - 11 = FSH treatment, day 11 = sponge removal (SR), day 18 = laparoscopy  
 (Lap). Feed: diet with 1.5 x maintenance of energy requirements. Propylene: diet with  
 1.5 x M plus administration of 80 mL/goat/day of propylene glycol during the hormonal  
 procedure. Insulin: diet with 1.5 x M plus three injections of insulin (0.2UI/kg BW/day)  
 at day 9, 10 and 11, simultaneously to FSH treatment.

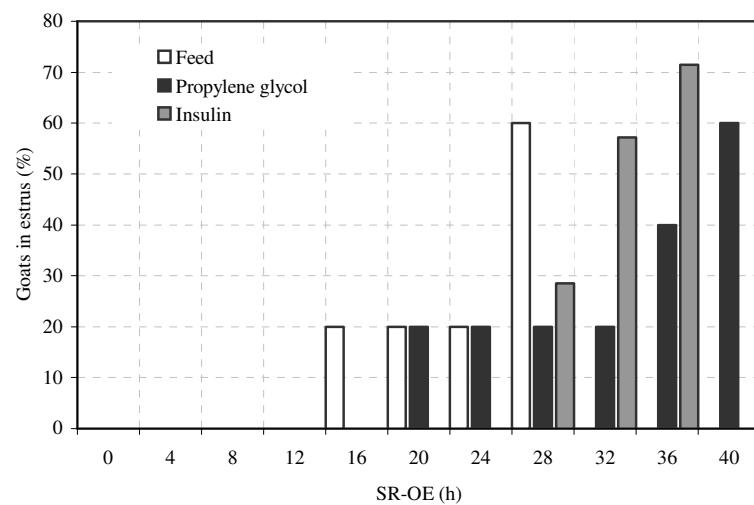


Figure 2: Cumulative distribution of goats in estrus during the interval (h) between sponge removal (SR) and onset of estrus (OE).

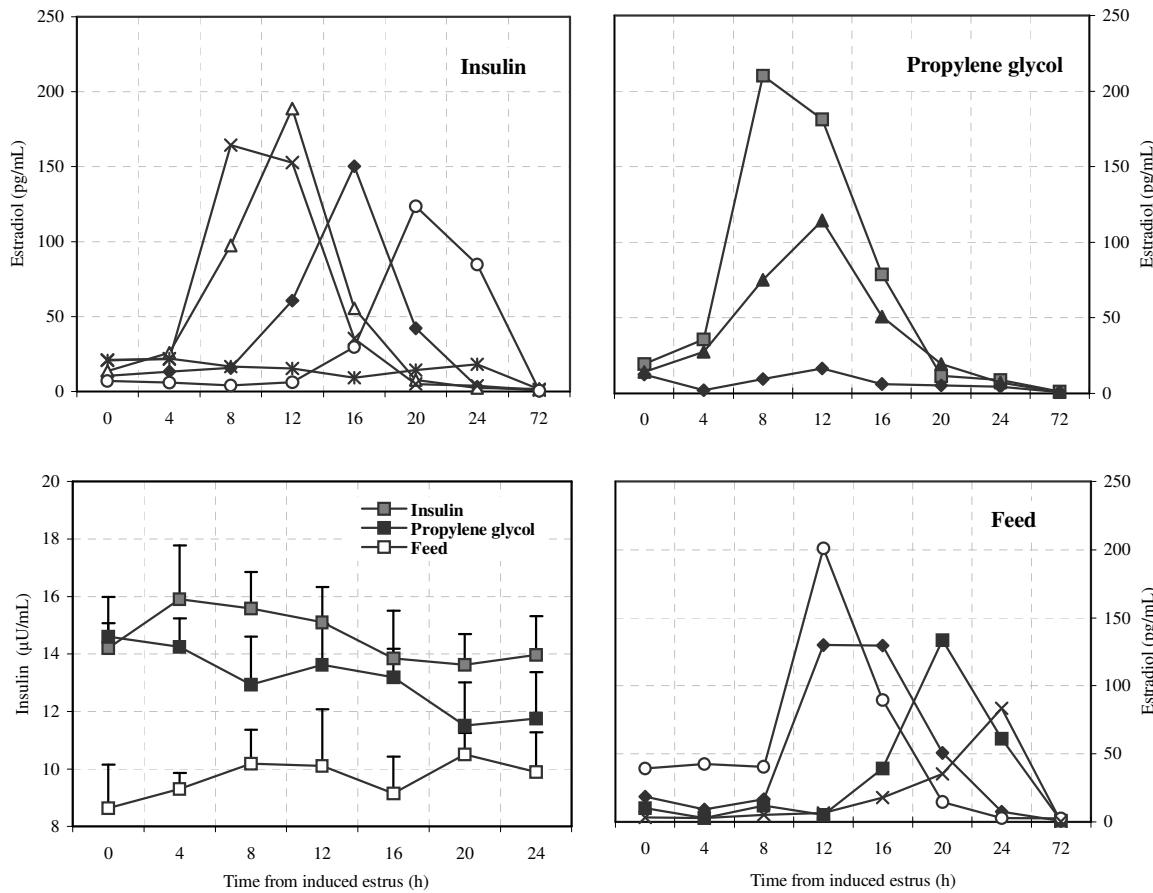


Figure 3: Estradiol and insulin levels according to the time of oestrus onset in ovulating goats with different energy protocols. In the figure, insulin values are given as means  $\pm$  SEM

Table 1. Estrus, ovarian and hormonal responses in goats with different energy protocols.

Values are given in means  $\pm$  SEM.

Parameters		Insulin	Propyl	Feed
Animals treated	n	7	5	5
<i>Oestrus response</i>				
Animals exhibiting oestrus	%	71 (5/7)	60 (3/5)	60 (3/5)
Interval SR - OE	h	31.20 $\pm$ 1.50	32.00 $\pm$ 6.11	24.00 $\pm$ 4.00
Interval oestrus occurrences	h	8 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	12 <sup>ab</sup>
<i>Ovarian response</i>				
Follicles 2 - 5 mm <sup>2</sup>	n	70 (7/7) <sup>a</sup>	24 (3/5) <sup>b</sup>	29 (4/5) <sup>b</sup>
Preovulatory follicles <sup>2</sup>	n	10 (4/7) <sup>a</sup>	5 (2/5) <sup>ab</sup>	1 (1/5) <sup>b</sup>
Animals ovulated	%	71 (5/7)	60 (3/5)	80 (4/5)
Animals with > 5 CL <sup>3</sup>	%	100 (5/5)	100 (3/3)	75 (3/4)
CL counted <sup>2</sup>	n	83 <sup>a</sup>	41 <sup>b</sup>	58 <sup>b</sup>
CL regressed <sup>2</sup>	n	14 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
<i>Hormonal response</i> <sup>4</sup>				
Insulin	$\mu$ U/mL	171.65 $\pm$ 9.40 <sup>a</sup>	156.85 $\pm$ 6.17 <sup>a</sup>	122.38 $\pm$ 4.04 <sup>b</sup>
Estradiol	pg/mL	228.36 $\pm$ 55.88	222.54 $\pm$ 93.49	232.61 $\pm$ 78.06

<sup>1</sup> Interval (h) between first and last estrus occurrences; <sup>2</sup> total number; <sup>3</sup> CL = corpora lutea;

<sup>4</sup> mean total amount; <sup>a,b,c</sup> P < 0.05.