



**MIGUEL PIZZOLANTE BOTTINO**

**PERFIL BIOQUÍMICO E QUALIDADE DE OÓCITO DE  
PRIMÍPARAS *Bos indicus* SUBMETIDAS AO PROTOCOLO  
DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO**

**LAVRAS – MG**

**2019**

**MIGUEL PIZZOLANTE BOTTINO**

**PERFIL BIOQUÍMICO E QUALIDADE DE OÓCITO DE PRIMÍPARAS *Bos indicus*  
SUBMETIDAS AO PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. José Nélio de Sousa Sales

Coorientador

Dr. José Camisão de Souza

**LAVRAS – MG**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Bottino, Miguel Pizzolante.

Perfil bioquímico e qualidade de oócitos de primíparas *Bos indicus* submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação / Miguel Pizzolante Bottino. - 2019.

80 p. : il.

Orientador(a): José Nélio de Sousa Sales.

Coorientador(a): José Camisão de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. IATF. 2. categoria animal. 3. zebu. I. Sales, José Nélio de Sousa. II. Souza, José Camisão de. III. Título.

**MIGUEL PIZZOLANTE BOTTINO**

**PERFIL BIOQUÍMICO E QUALIDADE DE OÓCITO DE PRIMÍPARAS *Bos indicus*  
SUBMETIDAS AO PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO**

**BIOCHEMICAL PROFILE AND OOCYTE QUALITY OF PRIMIPAROUS *Bos indicus*  
COWS SUBMITTED TO OVULATION SYNCHRONIZATION PROTOCOL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 de agosto de 2019.

Dr. José Camisão de Souza

UFLA

Dra. Nadja Gomes Alves

UFLA

Dr. Miller Pereira Palhão

Unifenas

Dr. Bruno Campos de Carvalho

Embrapa

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales

Orientador

**LAVRAS MG**

**2019**

*À Deus e à minha família, por serem a base de tudo.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por sempre me iluminar ao longo de minha caminhada. A minha Lisânia, pela eterna demonstração de amor e cumplicidade, pelo carinho, por estar ao meu lado nos momentos certos, sempre com o toque mais perfeito de dedicação e atenção. Agradeço a minha Mãe pelos conselhos, pelos direcionamentos de vida e por todo amor depositado. Ao meu Pai pelos ensinamentos repletos de infinita sabedoria, bom senso e pelo apoio incondicional. A minha Irmã pelas mais criativas formas de demonstrar carinho, pelo companheirismo e pela vivência compartilhada.

Aos meus Avós, sou grato pela tradição, a minha avó Yeda que sempre me ensinou o valor dos detalhes e da estrutura familiar, ao meu avô João (*in memorian*) pela educação e disciplina que irão sempre me guiar. Ao meu Avô Adalberto (*in memorian*) e minha Avó Célia (*in memorian*).

Ao meu Tio, Breno, que desde sempre me fez um Veterinário, agradeço pela extrema confiança depositada, ensinamentos, carinho e atenção que sempre me proporcionou. A minha Tia, Helena, agradeço pelos conselhos e carinho e ao meu Tio, Rômulo, por me ensinar o valor do pensamento e do conhecimento. Agradeço também a minha Tia-avó (Leda) pelo apoio sempre tão positivo e divertido.

Agradeço aos Amigos-irmãos pelo companheirismo infinito, que não se abala com nenhuma das mais diversas barreiras da vida!

Agradeço aos grandes Professores que tive, pois me ensinaram mais do que a profissão, mas sim, a ser um profissional do qual me orgulhar. Agradeço especialmente a meu orientador, José Nélio, por ter estado sempre presente, pelos ensinamentos, pelas oportunidades, confiança depositada, pela disciplina e seriedade com as quais sempre nos ensinou a trabalhar. Aos membros da banca de avaliação, agradeço pela atenção e pelo empenho em fazer com que esse estudo se torne ainda mais completo e possa cumprir seu propósito de auxiliar na atividade agropecuária do nosso país.

Ao longo dos anos de pós graduação tive o prazer de fazer diversas novas amizades e destaco meus agradecimentos ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, ao Departamento de Medicina Veterinária da UFLA e a fundação CAPES. Agradeço ao Laboratório de Apoio, Produção e Saúde Animal da UNESP - Araçatuba, nas pessoas do Professor Guilherme Nogueira e Marcos Maioli. Ao Laboratório de Análises Clínicas da FMVZ-USP, em especial à Cláudia. Ao Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da FZEA – USP, em especial ao Professor Felipe Percin e Gabriella Andrade.

Agradeço as fazendas que me receberam para os experimentos a campo, em especial a Fazenda Córrego da Prata (Samuel Oliveira). Por fim agradeço aos animais, que são o foco e a fonte de todo o nosso estudo.

## RESUMO

Atualmente, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) está bem estabelecida e pode ser aplicada rotineiramente em programas reprodutivos. Protocolos de IATF foram desenvolvidos para promover o controle das funções luteal e folicular, o que resulta em taxas satisfatórias de concepção. Algumas limitações na utilização da IATF são conhecidas e podem causar redução no retorno econômico da atividade. Uma dessas limitações é o uso de protocolos de IATF a base de estradiol/progesterona em vacas primíparas *Bos indicus*. Nessa categoria animal, parte da energia disponível proveniente da dieta ou do tecido adiposo, além de ser utilizada para a produção de leite e manutenção básica do animal, é direcionada para manter o crescimento corporal. Assim, os efeitos de falhas nutricionais na reprodução de vacas primíparas são mais acentuados do que em vacas multíparas. Apesar desses conhecimentos, ainda não existe na literatura avaliação detalhada de fatores que possam interferir negativamente na reprodução de vacas primíparas *Bos indicus*. Além disso, tais efeitos ainda não foram verificados na qualidade de oócito e de células foliculares. Devido a renovação anual de 15 a 25% do rebanho com novilhas de reposição, porcentagem considerável de fêmeas do rebanho é formada por vacas primíparas com baixa eficiência reprodutiva. Dessa forma, torna-se importante estabelecer quais são os fatores determinantes para a baixa fertilidade dessa categoria para que possamos delinear estudos capazes de propor soluções a esses problemas.

Palavras-chave: IATF, categoria animal, fertilidade, zebu.

## ABSTRACT

Currently, timed artificial insemination (TAI) is well established and can be routinely applied in reproductive programs. TAI protocols have been developed to promote control of luteal and follicular functions, which results in satisfactory conception rates. Some limitations in the use of TAI are known and may cause reduction in economic return of the activity. One of these limitations is the use of estradiol/progesterone protocols in primiparous *Bos indicus* cows. In this category, part of the energy available from the diet or adipose tissue, in addition of being used for milk production and basic maintenance of the animal, is also directed to maintain body growth. Thus, the effects of nutritional deficiencies on reproduction of primiparous cows are more pronounced than in multiparous cows. Despite this knowledge, there is still no detailed evaluation in the literature of factors that may negatively affect the reproduction of *Bos indicus* primiparous cows. Moreover, such effects have not yet been verified on oocyte and follicular cell quality. Due to the annual renewal of 15 to 25% of the herd with heifers, a considerable percentage of females in the herd are primiparous cows with low reproductive efficiency. Thus, it is important to establish what are the determining factors for low fertility in this category so that we can design studies capable of proposing solutions to these problems.

Keywords: TAI, parity, fertility, zebu.

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Gene alvo, sequência dos primers ( <i>forward</i> e <i>reverse</i> ), tamanho do amplicon (pares de base – pb) e número de acesso dos primers usados para RT-qPCR nas células do cumulus.....	67
<b>Tabela 2</b>	Símbolo e função dos genes avaliados nas células do cumulus no pós parto de primíparas e múltiparas <i>Bos indicus</i> .....	69
<b>Tabela 3</b>	Avaliação quantitativa e qualitativa (média±erro) de oócitos obtidos por aspiração folicular (OPU) em vacas <i>Bos indicus</i> primíparas (n=24) e múltiparas (n=24) submetidas a protocolo de sincronização da ovulação no pós parto recente.....	72
<b>Tabela 4</b>	Perfil metabólico e hormonal de vacas <i>Bos indicus</i> primíparas e múltiparas submetidas a aspiração folicular no dia 5 (folículos >3mm) e no dia 12 (folículo dominante) do protocolo.....	73
<b>Tabela 5</b>	Perfil metabólico e hormonal de vacas <i>Bos indicus</i> primíparas e múltiparas submetidas a protocolo de IATF a base de estrógeno e progesterona.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS

AgRP	Peptídeo relacionado ao gene Agouti
BE	Benzoato de estradiol
BEN	Balanço energético negativo
BHB	Beta-hidroxibutirato
CMS	Consumo de matéria seca
CART	Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
CL	Corpo lúteo
D	Dia
E <sub>2</sub>	Estrógeno
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
CE	Cipionato de estradiol
EPM	Erro padrão da média
FSH	Hormônio folículo estimulante
GH	Hormônio do crescimento
GLUT	Proteína transportadora de glicose
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
i.m.	Intra muscular
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1

IGFBP	Proteína ligadora de IGF
IP	Intervalo entre partos
<i>JAK</i>	Janus kinase
LH	Hormônio luteinizante
MC4R	Receptor de melanocortina tipo 4
N	Número
NPY	Neuropeptídeo Y
P4	Progesterona
P	Significância
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F 2 alfa
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
POMC	Pro-opiomelanocortina
rbST	Somatotropina bovina recombinante
SAS	Statistical Analysis System
STAT	Transdutora de sinal e ativadora de transcrição
UI	Unidades internacionais
US	Ultrassom
<i>vs</i>	<i>Versus</i>
$\alpha$ MSH	Hormônio estimulante de alfa-melanócitos

## SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	13
1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Inseminação artificial em tempo fixo (IATF).....	15
2.2	Categoria animal – primíparas.....	17
2.3	Metabolismo.....	20
2.3.1	Escore de condição corporal (ECC).....	20
2.3.2	Glicose.....	24
2.3.3	Insulina.....	26
2.3.4	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1).....	29
2.3.5	Ácidos graxos não esterificados (AGNE).....	31
2.3.6	Colesterol.....	31
2.4	Fertilidade.....	33
2.4.1	Qualidade oocitária.....	33
2.4.2	Expressão gênica no complexo cumulus-oócito (CCO).....	35
3	REFERÊNCIAS.....	39
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO.....	57
	ARTIGO: Perfil bioquímico e qualidade de oócito de primíparas <i>Bos indicus</i> submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação.....	57
1	Introdução.....	62
2	Material e métodos.....	62
3	Resultados.....	71
4	Discussão.....	75
	REFERÊNCIAS.....	78

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

A eficiente multiplicação de animais superiores por biotecnologias da reprodução pode proporcionar maior retorno econômico à agropecuária. Da mesma forma que, elevados índices reprodutivos, associados ao melhoramento genético, devem ser metas que norteiam os técnicos e criadores a alcançarem maior produtividade e lucratividade na pecuária. Programas de inseminação artificial (IA) após detecção de cio geram resultados satisfatórios em termos de taxa de concepção (DRANSFIELD *et al.*, 1998). No entanto, geralmente apresentam baixa taxa de prenhez devido à baixa taxa de serviço, associada frequentemente à dificuldades na detecção de cio.

Na atualidade, existe tecnologia para sincronizar o crescimento folicular e a ovulação em bovinos (BARUSELLI *et al.*, 2012). Com esse intuito, emprega-se uma sequência de tratamentos (protocolos) que têm como finalidade sincronizar a ovulação para o emprego da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que dispensa a necessidade de detecção do cio, tornando mais prático o uso dessa biotecnologia (BARUSELLI *et al.*, 2004; BÓ, G. A.; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003). Durante os últimos anos, essa nova biotecnologia (IATF) vem possibilitando maior aplicação da inseminação artificial (IA) nas fazendas, favorecendo o melhoramento genético dos rebanhos e aumentando a produtividade (BARUSELLI *et al.*, 2008).

No Brasil são vendidas mais de 14 milhões de doses de sêmen, sendo que mais de 8 milhões delas são direcionadas para o gado de corte (ASBIA, 2017). Em bovinos de corte, a inseminação artificial se expandiu com a utilização da sincronização da ovulação com progesterona e estradiol. Além disso, os resultados da IATF tem sido satisfatórios (ao redor de 50%) em rebanhos zebuínos de corte. No entanto, em determinadas situações tais como deficiência nutricional (baixa quantidade e/ou qualidade da forragem ofertada), animais com baixa condição corporal e vacas primíparas, os resultados da IATF não são consistentes (BARUSELLI *et al.*, 2012). Tal variação de resultados nas condições supracitadas foram, na sua maioria, sanados com o uso da gonadotrofina coriônica equina (eCG) no momento da

retirada do dispositivo de progesterona (FILHO, M. F. S. *et al.*, 2010; SALES *et al.*, 2011a). Porém, esse suporte gonadotrófico não tem sido totalmente eficiente em vacas primíparas, sendo os resultados inferiores aos de multíparas (FILHO, M. F. S. *et al.*, 2011; SALES *et al.*, 2012) e com grande variação.

Em vacas primíparas, a energia disponível proveniente da dieta ou do tecido adiposo, além de ser utilizada para a produção de leite e manutenção básica do animal, é direcionada para manter o crescimento do animal (FREETLY; NIENABER; BROWN-BRANDL, 2006). Assim, os efeitos de falhas nutricionais na reprodução de vacas primíparas são mais acentuados do que em vacas multíparas (DEROUEN *et al.*, 1994a). Apesar desses conhecimentos, ainda não existe na literatura avaliação detalhada de fatores metabólicos que possam interferir na reprodução de vacas primíparas *Bos indicus*. Além disso, tais efeitos ainda não foram verificados na qualidade de oócito e de células foliculares.

Sabe-se que a fertilidade das fêmeas é em grande extensão determinada pela qualidade do oócito, a qual é refletida na sua habilidade de progredir a meiose, ser fertilizado e possibilitar o desenvolvimento de um embrião viável. O estudo da expressão de fatores secretados localmente pelos oócitos, que são essenciais para adequada maturação, pode ser um importante passo para auxiliar a compreensão da reduzida qualidade gamética de vacas primíparas (GU *et al.*, 2015).

Diante da variação de resultados na IATF em vacas primíparas e menor eficiência reprodutiva em comparação à vacas multíparas, torna-se interessante avaliar os efeitos de fatores metabólicos (bioquímicos) na eficiência reprodutiva de vacas primíparas e multíparas *Bos indicus* no pós parto recente. Além disso, é interessante avaliar por técnicas de biologia molecular se a qualidade oocitária de primíparas está relacionada com seu baixo desempenho reprodutivo e em quais níveis isso ocorre. O estudo da expressão de genes relacionados à maturação oocitária poderia esclarecer se problemas de fertilidade dessa categoria estão relacionados a essa via. Esse estudo poderá embasar o desenvolvimento e adaptação de novas biotécnicas de reprodução assistida visando melhorar os índices reprodutivos em primíparas de corte. Ainda, essas avaliações embasarão conhecimentos sobre as diferenças metabólicas e moleculares entre vacas primíparas e multíparas *Bos indicus* que possibilitarão a identificação dos problemas reprodutivos dessa categoria (primíparas). Com os conhecimentos gerados nesse estudo, novas hipóteses poderão ser criadas para resolução de tais problemas. Tendo em vista que a maioria do rebanho nacional é formada por vacas *Bos indicus* e cruzamento *Bos*

*indicus x Bos taurus* e devido a participação considerável de vacas primíparas no rebanho, em correspondência a taxa de renovação anual de 15 a 25% com novilhas de reposição, os estudos focados nessa categoria animal são de grande impacto para a cadeia de produção.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)**

Os programas de IATF são amplamente utilizados devido a sua capacidade de aumentar o número de fêmeas inseminadas, sem que haja a necessidade de detecção de estro (SÁ FILHO, M. F. *et al.*, 2011). A sincronização dos ciclos estrais permite o encurtamento da estação reprodutiva, maior uniformidade dos bezerros e maior facilidade do uso da inseminação artificial (LAMB, G. C. *et al.*, 2010). Tal técnica possibilita a introdução de genética melhoradora no rebanho, com custo inferior a aquisição de reprodutores melhoradores (LAMB, G. C. *et al.*, 2010).

Inicialmente, protocolos de sincronização utilizavam prostaglandina para promover a regressão do corpo lúteo e posterior detecção de estro, 2 a 6 dias após a administração. Posteriormente, a inclusão de progestágenos exógenos passou a ser considerada, com o intuito de atrasar o início do estro após luteólise espontânea ou induzida (LUCY *et al.*, 2001). Como nos bovinos os folículos ovarianos crescem em padrão de ondas com a presença de um folículo dominante (FORTUNE; SIROIS; QUIRK, 1988), autores passaram a considerar o controle folicular pela administração do GnRH, para induzir pico de LH e posterior ovulação ou luteinização do folículo dominante ( $\geq 10$  mm) (SARTORI *et al.*, 2001). Consequentemente, uma nova onda folicular é iniciada 1,5 a 2 dias após administração de GnRH em fêmeas cuja ovulação ocorreu. Após a ovulação, o tecido luteal formado é responsivo à luteólise induzida pela PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  6 ou 7 dias após a ovulação (TWAGIRAMUNGU; GUILBAULT; DUFOUR, 1995). No entanto, a indução da ovulação pela administração do GnRH é influenciada pelo estágio do ciclo estral no momento da administração desse hormônio (WILTBANK, M. C. *et*

*al.*, 2011). Sendo assim, os protocolos de IATF a base de GnRH estão geralmente associados à resultados inconsistentes em rebanhos de corte, principalmente pelo grau de anestro pós parto observado em *Bos indicus*, impedindo que haja folículo dominante responsivo a indução da ovulação e impossibilitando, assim, a sincronização eficiente da emergência de uma nova onda folicular subsequente (BÓ, G. A.; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003; GEARY *et al.*, 1998).

O  $17\beta$ -estradiol ( $17\beta$ -E2), ou um de seus ésteres (benzoato e valerato), são alternativas para a sincronização da emergência de uma nova onda folicular, quando associados à progesterona, por induzirem a regressão folicular. O mecanismo responsável por tal supressão está envolvido com a inibição na secreção de FSH (BÓ *et al.*, 2002; BÓ, G. A. *et al.*, 1996) e LH (BURKE; MACMILLAN; BOLAND, 1996) devido ao bloqueio na liberação de GnRH pelo hipotálamo. Após essa associação, uma nova onda folicular se inicia entre o terceiro e quarto dia (BÓ, G. A.; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003). Após o crescimento folicular e remoção da progesterona (por administração da  $PGF_{2\alpha}$  e retirada do dispositivo de progesterona), realiza-se a administração do indutor da ovulação, para que tal evento ocorra de forma sincronizada. Para isso, o cipionato de estradiol (CE) tem sido utilizado em larga escala nos protocolos de IATF em vacas zebuínas (*Bos indicus*) (MENEGETTI *et al.*, 2009; PERES *et al.*, 2009), uma vez que é capaz de induzir a ovulação em aproximadamente 80% das fêmeas tratadas (SALES *et al.*, 2012). A indução da ovulação também pode ser realizada através da administração de benzoato de estradiol, GnRH, LH ou hCG. O momento da administração do indutor de escolha varia de acordo com as propriedades farmacocinéticas destes compostos, podendo ser administrado no momento da retirada do dispositivo de progesterona ou 24 horas após, para induzir o pico de LH e a ovulação de forma sincronizada (HANLON *et al.*, 1997; MARTÍNEZ *et al.*, 2005).

Em *Bos indicus*, as vacas geralmente permanecem em anestro pós parto por um longo período. Nessas vacas, os pulsos de liberação de LH são insuficientes para promover o desenvolvimento final do folículo dominante, o que limita a eficiência dos protocolos tradicionais de IATF (BARUSELLI *et al.*, 2004). Sendo assim, o uso de gonadotrofinas, em especial a gonadotrofina coriônica equina (eCG), apresenta benefícios quando associado aos protocolos de sincronização de estro e da ovulação pois intensifica o crescimento final do folículo dominante (DUFFY *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que a administração da eCG aumenta a incidência de ovulação em vacas com comprometimento do escore de condição corporal e primíparas (BOTTINO, 2014), uma vez que a eCG é capaz de estimular o

crescimento final do folículo dominante se ligando a receptores de LH e FSH (BÓ, G. A.; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003).

## **2.2.Categoria animal - primíparas**

O período de anestro pós parto em vacas zebuínas é um desafio para obter alta eficiência reprodutiva, uma vez que possui maior duração em relação ao apresentado por vacas *Bos taurus* (VASCONCELOS *et al.*, 2009). Além disso, o estro de vacas de corte *Bos indicus* é mais curto quando comparado ao de vacas taurinas, o que reduz os índices reprodutivos nesse grupo genético (PINHEIRO *et al.*, 1998).

Esses desafios são ainda mais importantes em vacas primíparas submetidas à pastejo extensivo, pois nessas condições, a ingestão de nutrientes no período pós parto não é suficiente para atender às exigências metabólicas de crescimento corporal somadas à lactação, o que leva essa categoria a um anestro pós parto ainda mais prolongado, em consequência da diminuição acentuada nos pulso de LH quando comparadas a múltíparas (FAJERSSON; STANKO; WILLIAMS, 1999; GRIMARD *et al.*, 1995; SÁ FILHO, O G *et al.*, 2010; SHARPE *et al.*, 1986; YAVAS; WALTON, 2000).

Sabe-se então que os efeitos de falhas nutricionais na reprodução de vacas primíparas são mais acentuados do que em vacas múltíparas (DEROUEN *et al.*, 1994b), mas apesar desses conhecimentos, ainda não existe na literatura uma avaliação detalhada de fatores metabólicos que possam interferir na reprodução de vacas primíparas *Bos indicus*. Além disso, tais efeitos ainda não foram verificados na qualidade de oócito e de células foliculares.

Em vacas em anestro, o tratamento com progesterona aumenta a secreção de LH (GARCIA-WINDER *et al.*, 1987), que é importante para a retomada da ciclicidade ovariana após o parto (SÁ FILHO, OCILON GOMES; THATCHER; VASCONCELOS, 2009). Tal ação da progesterona resulta em elevação nas concentrações intrafolicular e circulante de estradiol e no número de receptores de LH nas células da granulosa e da teca em folículos pré ovulatórios (GARCIA-WINDER *et al.*, 1987; RHODES, F. M. *et al.*, 2002). Tal suplementação não se mostrou eficiente em equiparar as taxas de prenhez de primíparas e múltíparas *Bos taurus* submetidas a protocolos de sincronização da ovulação no pós parto

recente (SIMÕES *et al.*, 2018). Uma forma de aumentar o desempenho de primíparas em protocolos de IATF é antecipar o momento de realização do manejo hormonal. Normalmente, vacas zebuínas ou taurinas atingem seu pico de lactação entre 9 e 11 semanas após o parto, já em vacas primíparas existe tendência de que esse pico de produção seja mais tardio (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Portanto, é possível que haja elevação na taxa de fertilidade de primíparas submetidas a protocolos de IATF uma vez que a sincronização do estro se inicie antes do período de máxima exigência nutricional relacionada ao pico de produção de leite (SÁ FILHO, M. F. *et al.*, 2010).

A utilização da gonadotrofina coriônica equina, também se apresenta como uma alternativa para elevar a resposta ovulatória ao protocolo de IATF, pois intensifica o crescimento final do folículo dominante, principalmente em vacas com comprometimento do escore de condição corporal e de categoria primípara, uma vez que a eCG é capaz de se ligar a receptores de LH e FSH (BÓ, G. A.; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003; BOTTINO, 2014; DUFFY *et al.*, 2004; SALES *et al.*, 2016).

Apesar da utilização dessas alternativas para tentar minimizar a variação de resultados na IATF em vacas primíparas e tentar elevar sua eficiência reprodutiva, os resultados ainda são inconsistentes, o que torna interessante avaliar os efeitos de fatores metabólicos (bioquímicos) na eficiência reprodutiva de ambas as categorias no pós parto recente. Além disso, é interessante avaliar por técnicas de biologia molecular se a qualidade oocitária de primíparas está relacionada com seu baixo desempenho reprodutivo e em quais níveis isso ocorre. O estudo da expressão de genes relacionados à maturação oocitária poderia esclarecer se problemas de fertilidade dessa categoria estão relacionados a essa via.

Outro ponto importante a ser levado em consideração é o balanço energético negativo (BEN), condição que caracteriza a vaca de corte no período pós-parto, que pode atrasar o início da ovulação por meio da redução na frequência dos pulsos de LH e de baixas concentrações plasmáticas de glicose, insulina e IGF-1 que, coletivamente, limitam a síntese de E<sub>2</sub> pelo folículo dominante (BUTLER, 2000), por meio da redução do crescimento, diferenciação e multiplicação das células da teca e da granulosa, tornando-as menos sensíveis às gonadotrofinas (CAMPBELL *et al.*, 2006).

O manejo nutricional do rebanho de cria tem grande impacto sobre os índices reprodutivos, sendo a energia o nutriente primário necessário para a reprodução (HESS *et al.*,

2005). No entanto, para a maioria dos rebanhos de cria, a suplementação mineral, quando existente, é geralmente a única fonte de nutrientes disponível além das pastagens. Nesta condição, a oferta e qualidade limitadas das pastagens naturais em determinados períodos do ano, aliado ao manejo inadequado das mesmas, devido ao excesso de carga animal usualmente empregado, podem não atender a demanda nutricional das vacas primíparas, o que leva a um balanço energético pós-parto negativo (GODOY *et al.*, 2015). Sob esta condição, a frequência de pulsos de LH, taxa de crescimento do folículo dominante, concentração de GH, IGF-1, glicose e insulina são reduzidos, o que diminui a condição corporal e aumenta a porcentagem de anestro pós-parto. A glicose é um dos substratos metabólicos mais importantes envolvidos com o sucesso reprodutivo em gado de corte, sendo a fonte primária de energia utilizada pelo sistema nervoso central, que desempenha um papel importante na liberação de GnRH, sendo crucial para a síntese e liberação de FSH e LH (HESS *et al.*, 2005).

Vários estudos têm destacado a importância do escore de condição corporal (ECC) ao parto e no pós-parto. Vacas com bom ECC (mínimo de 5, em uma escala de 1 a 9) no momento do parto possuem menor intervalo entre o parto e a primeira ovulação, menor período de anestro pós-parto e menor intervalo entre partos (EMERICK *et al.*, 2009). O aumento do fornecimento de alimento no pós-parto reduz, mas não exclui, o efeito negativo da restrição nutricional no pré-parto (LAMB, C., 1999), já que o início do crescimento dos folículos primordiais se dá 60 dias antes de estes atingirem o tamanho de dominância (GINTHER *et al.*, 1996). Vale ressaltar que a manutenção da condição corporal de vacas no pré-parto é uma ferramenta mais econômica sob o ponto de vista metabólico, pois durante a gestação os animais tendem a ganhar peso mais facilmente (anabolismo gestacional). No pós-parto, devido à condição catabólica em que se encontram os animais, o custo desta se torna mais oneroso em relação ao pré-parto (LAMB, C., 1999). Emerick, *et al.* (2009) relatam a importância do ECC pré-parto sobre a manifestação de estro, salientando que, para se obter o máximo de desempenho, a vaca deve estar prenhe até 83 dias pós-parto.

Outro fato importante que tem sido atribuído ao prolongado período de anestro pós-parto é a presença do bezerro ao pé. Stagg *et al.* (1998) verificaram que vacas que foram manejadas separadas da cria por um período de 24 horas, a partir de 30 dias pós-parto, tiveram a frequência dos pulsos de LH e a concentração de IGF-1 aumentadas em relação ao controle, bem como o período de serviço encurtado. Além disso, animais que não obtiveram contato visual e olfatório com suas crias possuíram um período de anestro mais curto do que os animais separados com contato simples (mantiveram contato visual e olfatório). Nesse

mesmo trabalho, outro aspecto observado foi de que não houve interação entre os planos nutricionais e manejo de mamada em relação a duração do anestro pós parto, mostrando que a presença da cria tem relevância no retorno à atividade ovariana cíclica em vacas no pós-parto (STAGG *et al.*, 1998).

A secreção cíclica de LH, essencial para o retorno a ciclicidade ovariana, é também controlada pelos efeitos negativos e positivos do estrógeno ( $E_2$ ). A sensibilidade ao efeito negativo do  $E_2$  sobre o hipotálamo é aumentada pela presença da cria, levando a diminuição na secreção de LH e maior duração do anestro pós parto (MADEJ *et al.*, 2005; STAGG *et al.*, 1998).

## **2.3. Metabolismo**

### **2.3.1. Escore de condição corporal (ECC)**

Uma importante fonte de perda econômica em rebanhos bovinos de corte é o aumento do intervalo entre partos em resposta ao estresse nutricional, geralmente relacionado ao elevado gasto energético na lactação (YAVAS; WALTON, 2000) e a baixa disponibilidade de alimento para vacas *Bos indicus* criadas de forma extensiva (BARUSELLI *et al.*, 2012). Em condições de déficit nutricional, ocorre redução na liberação de GnRH e, conseqüentemente, nos pulsos de LH (LI, P. S.; WAGNER, 1983). Tal condição resulta em ondas foliculares sem demonstração de estro ou mesmo com ausência de ovulação (BASTOS *et al.*, 2004). O ECC pode ser usado como indicador do estado energético de um animal (DEROUEN *et al.*, 1994a), se apresentando como método acurado e de alta repetibilidade para a estimativa das reservas corporais de gordura em raças bovinas de corte, sendo útil na evidencição dos indivíduos despreparados para ingressarem aos programas convencionais de reprodução assistida (VIZCARRA *et al.*, 1998a; WAGNER *et al.*, 1988). Em uma escala de 1 – 5 (AYRES *et al.*, 2009), sendo 1 o indivíduo magro e 5 um animal obeso, indica-se 2,5 como o escore mínimo

para uma resposta bem sucedida em protocolos de IATF direcionados a vacas *Bos indicus* (BARUSELLI *et al.*, 2004; CUTAIA *et al.*, 2003).

O manejo nutricional adequado dos animais e a intervenção hormonal podem ser considerados como alternativas para minimizar os efeitos negativos na reprodução (taxas de ovulação e concepção) promovidas pelo baixo ECC do rebanho durante o período pós parto (RIVERA *et al.*, 1998). Dentre essas alternativas, destaca-se o desmame temporário (SHIVELY; WILLIAMS, 1989), a administração exógena de análogos do GnRH (WETTEMANN *et al.*, 1982), a administração exógena de estrógeno (GARCIA-WINDER; LEWIS; INSKEEP, 1988; SAIDUDDIN; QUEVEDO; FOOTE, 1968) e a administração de gonadotrofinas, como a eCG (SALES *et al.*, 2011b).

O balanço energético negativo (BEN) reduz a disponibilidade de glicose e aumenta a mobilização das reservas energéticas corporais (GRIMARD *et al.*, 1995). O metabolismo basal, a atividade, o crescimento e as reservas de energia básica têm prioridade sobre os processos reprodutivos, como o início da ciclicidade e o estabelecimento e manutenção da gestação (GRIMARD *et al.*, 1997; GUEDON; SAUMANDE; DESBALS, 1999; SHORT, R E; BELLOWS, R A; STAIGMILLER, R B; BERARDINELLI, J G; CUSTER, 1990). O efeito da nutrição sobre a reprodução durante o período pós parto tem sido amplamente estudado (DHUYVETTER; CATON, 1996; HAWKINS *et al.*, 2000; MAGGIONI *et al.*, 2008; RANDEL, 1990; RICE, 1991). Partindo-se do princípio de que vacas que estão no período pós parto devem estar em bom estado de condição corporal na retomada da ciclicidade e, uma vez que o escore condição corporal pós parto é um reflexo do estado nutricional antes do parto (DEROUEN *et al.*, 1994b; SPITZER *et al.*, 1995), o retorno à ciclicidade no período pós parto é mais afetado pela ingestão de energia antes do parto do que depois (MORRISON; SPITZER; PERKINS, 1999; SHORT, R E; BELLOWS, R A; STAIGMILLER, R B; BERARDINELLI, J G; CUSTER, 1990).

A redução do consumo de energia ou proteína bruta antes do parto (CONNOR *et al.*, 1990; LALMAN *et al.*, 1997; ROBERTS *et al.*, 1997; WRIGHT *et al.*, 1992), ou mesmo após o parto (BASTIDAS *et al.*, 1990; RUTTER; RANDEL, 1984), reduz o conteúdo de gonadotrofinas hipofisárias e a responsividade ao GnRH exógeno, atrasa a retomada da pulsatilidade do LH e prolonga a aciclicidade pós parto. A desnutrição diminui a liberação de LH em vacas de corte no pós parto (PERRY *et al.*, 1991), embora Rutter e Randel (1984) não tenham visto este efeito.

Segundo alguns autores, reduzir a ingestão de energia após o parto até o 30º dia pós-parto (AHMADZADEH; BARNES; PEARSON, 1998; BEAM, STEPHEN W; BUTLER, 1997) ou aumentar o consumo de energia após o parto até a primeira ovulação pós parto (FRIES; NEUENDORFF; RANDEL, 1998) não afetou o intervalo entre partos. Outros estudos demonstram que o aumento no consumo de energia após o parto encurtou o intervalo entre partos em primíparas com baixo escore de condição corporal (LALMAN *et al.*, 2000) e aumentou as concentrações de LH circulante (HIGHTSHOE *et al.*, 1991). Em relação ao manejo nutricional pré parto, o aumento na ingestão de energia na dieta 2 meses antes do parto pode promover diminuição no intervalo pós parto (ESPINOZA; JIMENEZ; FLORES, 1995). Aumentar a ingestão de energia duas semanas antes do parto (LAMMOGLIA *et al.*, 1996), no parto (BEAM, STEPHEN W; BUTLER, 1997; FRIES; NEUENDORFF; RANDEL, 1998) ou quatro semanas após o parto (KHIREDDINE *et al.*, 1998), leva a um aumento no número de folículos ovarianos.

A má nutrição é uma causa reconhecida de redução da fertilidade em bovinos manejados a pasto em regiões tropicais ou subtropicais. A restrição de energia na dieta afeta negativamente a função ovariana em novilhas pré e pós-púberes, reduzindo o diâmetro máximo e a persistência de folículos dominantes, e em vacas pós-parto retardando o desenvolvimento de grandes folículos ovarianos (RHODES, F. *et al.*, 1995; RHODES, F.; ENTWISTLE; KINDER, 1996; WILTBANK, M.; GUMEN; SARTORI, 2002).

O padrão de crescimento folicular foi estudado em 17 vacas zebuínas paridas, durante o período de 12 meses (parto até desmame) sob manejo extensivo em ambiente tropical (RUIZ-CORTEZ; OLIVERA-ANGEL, 1999). Durante os primeiros 6 meses pós parto, a maior parte destas vacas tiveram longos períodos em que os folículos cresceram até diâmetro próximo a 6 mm (interdominância). Em determinadas ocasiões, observou-se um folículo alcançando diâmetros próximos a 8mm, com períodos de interdominância entre essas ondas foliculares de  $17,8 \pm 1,7$  dias, com variações entre 0 (ondas sobrepostas) e 60 dias. Entre 7 e 12 meses pós-parto, as ondas foliculares foram mais regulares, com períodos de interdominância de  $4,4 \pm 0,3$  dias. A ciclicidade foi retomada aos 217-278 dias pós-parto, com expressão de estro precedendo a ovulação em 43% dos casos. Esta condição pode não ser incomum em rebanhos constituídos por vacas *Bos indicus* e deve ser levada em consideração na implantação de programas de inseminação artificial (IA). Vacas nessas condições apresentariam baixas taxas de resposta aos protocolos de sincronização da ovulação (BÓ *et al.*, 2002; WILTBANK, M.; GUMEN; SARTORI, 2002).

A maior parte das vacas com bom escore de condição corporal no parto é capaz de retomar a ciclicidade (VIZCARRA *et al.*, 1998b) e iniciar nova gestação (DEROUEN *et al.*, 1994b; SPITZER *et al.*, 1995) até o final da estação reprodutiva. Tal situação pode ser justificada pelo fato de que o escore de condição corporal no parto correlaciona-se positivamente com o desenvolvimento folicular pós parto (RYAN *et al.*, 1994), com o conteúdo de LH na hipófise aos 30 dias pós parto (CONNOR *et al.*, 1990) e com a concentração sérica de IGF-I (BISHOP; WETTEMANN; SPICER, 1994).

Uma substância que pode ser utilizada como um indicador do ECC é a leptina, uma adipocitocina, ou seja, substância secretada pelas células do tecido adiposo, considerada como um sinal adipostático ao cérebro e aos tecidos periféricos sobre o balanço energético e as reservas corporais em mamíferos (CATUNDA *et al.*, 2014). A ação da leptina se dá através de um receptor de membrana no hipotálamo, relacionado em estrutura e mecanismo de ação ao receptor do hormônio do crescimento, gerando sinais de saciedade. Durante os períodos em que a energia está sendo mais gasta do que ingerida, como no jejum ou na restrição alimentar, o tecido adiposo perde massa. Nestas condições, a secreção de leptina e a de insulina caem e as reservas de energia são mobilizadas e utilizadas (CATUNDA *et al.*, 2014).

A leptina em domínio extracelular se liga a receptores transmembrana do tipo OB-Rb, que em seguida são fosforilados em resíduos de tirosina pela *Janus kinase 2* (JAK2). Quando em domínio intracelular, se liga às proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição (STATs). As STATs, fosforiladas também pela JAK2, dissociam-se do seu receptor de membrana e formam homo ou heterodímeros no citoplasma, os quais seguem para o núcleo, onde vão se ligar a sequências específicas no DNA, para expressão de genes alvo e liberação de fatores específicos, como o neuropeptídeo Y (NPY) e a proopiomelanocortina (POMC), neurotransmissores cuja produção é regulada pela leptina nos neurônios hipotalâmicos. Desta forma, a leptina exerce o papel sinalizador e regulatório da homeostase energética por meio de mecanismos de ação central e periférica (CATUNDA *et al.*, 2014).

De forma central, a leptina age reprimindo a produção do neuropeptídeo Y, que é um poderoso estimulador do apetite. Ao mesmo tempo, a leptina reprime a produção do peptídeo relacionado ao agouti (AgRP), antagonista dos peptídeos anorexigênicos (MC4R e  $\alpha$ MSH). Em outro grupo de neurônios, a leptina estimula a produção dos compostos da proopiomelanocortina (POMC), como o  $\alpha$ MSH, e a produção do transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), que são responsáveis pela inibição do apetite. Dessa forma, a

leptina diminui o consumo de alimentos e aumenta o gasto energético, pela inibição simultânea do NPY, do AgRP, e pela estimulação do  $\alpha$ MSH e CART quando se liga a neurônios específicos no hipotálamo (CATUNDA *et al.*, 2014).

A regulação de leptina pela nutrição é mediada em parte pela insulina. A expressão de leptina aumenta após um pico na secreção de insulina durante a alimentação (SALADIN *et al.*, 1995). A insulina estimula a expressão da leptina diretamente nos adipócitos (RENTSCH; CHIESI, 1996) e aumenta as concentrações de leptina quando injetada em roedores (SALADIN *et al.*, 1995), assim parece haver uma relação diretamente proporcional entre as concentrações desses hormônios.

A leptina pode agir também de maneira direta sobre as gônadas, provocando aumento na produção de esteróides sexuais, evidenciado pelo aumento do peso do útero, em função da proliferação das glândulas, epitélio e endométrio uterino, e de maneira indireta, através da sua ação sobre o eixo hipotálamo-hipófise, aonde atuaria informando sobre o estado nutricional do animal, permitindo que o processo reprodutivo siga em frente na presença de reservas energéticas disponíveis, caso contrário, a reprodução é bloqueada (BARASH *et al.*, 1996).

Embora tenha sido proposto que a leptina atue diretamente nos neurônios do GnRH, evidências recentes indicam que os corpos celulares do GnRH não são diretamente afetados pela leptina. É mais provável que outros neuropeptídeos, como o NPY, a POMC e a kisspeptina façam a mediação da ação da leptina (CATUNDA *et al.*, 2014).

A leptina é um hormônio que pode atuar tanto periféricamente no ovário, quanto centralmente no hipotálamo, para auxiliar na função reprodutiva das fêmeas. Como a concentração desse composto está proporcionalmente relacionada às reservas energéticas corporais, pode ser indiretamente estimada pela avaliação do escore de condição corporal do indivíduo (HAUSMAN; BARB; LENTS, 2012).

### **2.3.2. Glicose**

Embora as mudanças nos metabólitos sanguíneos e hormônios metabólicos tenham sido usados para avaliar potenciais relações de causa e efeito entre nutrição e reprodução sem

conclusões óbvias (HESS *et al.*, 2005), argumentos convincentes têm mostrado que vários sinais relacionados a nutrição servem como sinalizadores para o eixo reprodutivo. A glicose é um dos substratos metabólicos mais importantes e necessários para o funcionamento adequado dos processos reprodutivos em vacas de corte (SHORT; ADAMS, 1988). A glicose é o principal combustível metabólico usado pelo sistema nervoso central, e a disponibilidade inadequada de glicose pode reduzir a liberação hipotalâmica de GnRH (KEISLER; LUCY, 1996). A capacidade de manutenção de concentrações constantes de glicose no sangue por vacas de corte, no entanto, levou alguns revisores a sugerir que o papel da glicose na mediação do controle nutricional da reprodução é permissivo e não causador (KEISLER; LUCY, 1996; SCHILLO, 1992).

A baixa concentração sérica de glicose pode ser detectada pelo hipotálamo, de modo que a secreção de GnRH pode ser prejudicada caso a disponibilidade de glicose for inadequada (RANDEL, 1990). O estímulo central para promover a secreção de GnRH é possível, através da elevação da gliconeogênese via manipulação dietética (RANDEL, 1990).

As consequências da diminuição na disponibilidade de energia poderiam levar ao aumento da mobilização do tecido adiposo e aumento da circulação de ácidos graxos não esterificados (AGNE). Baixa concentração de glicose com acúmulo concomitante de AGNE leva a síntese de cetonas (DICOSTANZO; WILLIAMS; KEISLER, 1999). Hawkins *et al.*, (2000) argumentaram que precursores glicogênicos inadequados prejudicam a utilização de acetato (principal ácido graxo volátil produzido via fermentação ruminal), redirecionando-o para a síntese de beta-hidroxibutirato. Estudos demonstraram que a infusão intraruminal de acetato por 96 h em novilhas ovariectomizadas com balanço energético negativo resultou em concentrações plasmáticas aumentadas de acetato, beta-hidroxibutirato e AGNE. Concomitante as alterações plasmáticas desses metabólitos, as concentrações séricas e amplitude dos pulsos de LH foram reduzidas (DICOSTANZO; WILLIAMS; KEISLER, 1999).

SHORT e ADAMS (1988) observaram que a concentração de glicose em vacas apresentando anestro pós-parto é influenciada pela condição corporal, o que interfere diretamente na reprodução, pois esta substância é a única fonte de energia utilizada pelo sistema neural e, considerando que o sistema neuro-endócrino está intimamente envolvido no controle reprodutivo e secreção hormonal, a concentração sérica da glicose pode ser considerada como um mediador específico para os efeitos da ingestão de energia sobre a reprodução.

Vacas em condições debilitadas ao parto apresentaram concentrações sanguíneas de AGNE elevadas, juntamente com baixas concentrações de IGF-I, glicose e insulina. Essa condição sanguínea compromete a retomada da atividade ovariana e conseqüentemente a fertilidade e início da gestação, uma vez que promove uma diminuição na concentração de progesterona, por ausência de ciclicidade e formação de corpo lúteo (CUNHA, 2003; THATCHER *et al.*, 2006).

Entre os efeitos da nutrição na reprodução, é provável que o balanço energético seja o mais importante fator nutricional ligado a baixa função reprodutiva em vacas. As vacas de corte precisam apresentar boa condição corporal para retomarem a ciclicidade estral após o parto e superarem a infertilidade em geral, na tentativa de manter o intervalo entre partos anual de forma satisfatória (OCCHIO; BARUSELLI; CAMPANILE, 2019). O melhor índice energético aumenta as concentrações de IGF-I e insulina no plasma de bovinos, promovendo efeitos diretos em células ovarianas em cultivo *in vitro*, incluindo o estímulo esteroidogênico nas células da granulosa (SPICER, L.; ECHTERNKAMP, 1995).

### **2.3.3. Insulina**

A insulina é um hormônio peptídico sintetizado e secretado pelas células  $\beta$  do pâncreas, em resposta a glicose e seus precursores, sendo metabolizada pelo fígado e rins (AZEVEDO; COELHO, 2016). No entanto, os fatores que influenciam a liberação de insulina em bovinos ainda não são totalmente conhecidos (BOSSAERT *et al.*, 2008). Esse hormônio possui funções em diversos tecidos corporais e, principalmente, possui efeitos no metabolismo de glicose, aminoácidos e lipídios. No geral, desempenha papel importante no armazenamento de energia e regulação da homeostase da glicose. A insulina também possui relações com outros hormônios, como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), e atua no sistema reprodutivo (WEBB *et al.*, 2007).

A captação de glicose é provavelmente a ação mais estudada da insulina em vacas leiteiras (KOSTER; OPSOMER, 2013). A maioria das células capta a glicose por difusão facilitada, pelas moléculas transportadoras de glicose (GLUT). Essa captação é basicamente

conduzida pela diferença na concentração de glicose entre o fluido extracelular e intracelular, para manter a homeostase (ZHAO; KEATING, 2007).

Existem 14 isoformas diferentes de GLUTs, com especificações na distribuição nos tecidos, no perfil de expressão e nas propriedades quanto à sensibilidade a hormônios. Quantitativamente, os maiores consumidores de glicose são os músculos esqueléticos, a glândula mamária e o útero gestante (KOSTER; OPSOMER, 2013). O GLUT-4 é responsável pela absorção de glicose estimulada por insulina, sendo localizado no músculo esquelético, coração e tecido adiposo (DUHLMEIER *et al.*, 2005; ZHAO; KEATING, 2007). Na glândula mamária, tecidos fetais e no fígado, por exemplo, existe, principalmente, o GLUT-1, que é independente de insulina (ZHAO; KEATING, 2007). A independência da glândula mamária para a absorção de glicose é demonstrada pela redução da expressão de GLUT-4 durante a lactação e aumento do GLUT-1. A expressão da maioria dos transportadores de glicose na glândula mamária, e particularmente o GLUT-1, aumenta de cinco a 100 vezes no início da lactação, permitindo que o úbere consiga consumir grande parte da glicose disponível na corrente sanguínea. Já na glândula mamária não lactante, a expressão do GLUT-1 é dificilmente detectada (ZHAO; KEATING, 2007).

Durante o período de transição de vacas leiteiras, que se dá durante as três semanas finais da gestação e três semanas iniciais da lactação, as mudanças na concentração de hormônios e as respostas dos tecidos a esses hormônios são focadas em atribuir prioridade energética para o útero gestante e para a glândula mamária (BAUMAN; BRUCE CURRIE, 1980). A preservação da glicose suficiente para o crescimento, desenvolvimento fetal e lactação, geram alterações no metabolismo da glicose em todo o corpo, como exemplo, no músculo esquelético e no tecido adiposo, onde o consumo de glicose é reduzido (KOSTER; OPSOMER, 2013).

Na fase de transição ocorre redução no consumo de matéria seca (CMS), levando os animais ao balanço energético negativo no pós-parto (ESPOSITO *et al.*, 2013). Nessa fase, parte das reservas corporais são mobilizadas, levando à perda de ECC e declínio nas concentrações basais de insulina (BOSSAERT *et al.*, 2008), sendo essas, mudanças fundamentais para o redirecionamento do fluxo de energia nesses animais (MARETT *et al.*, 2015; SCHOENBERG; EHRHARDT; OVERTON, 2012). No processo de mobilização de gordura corporal, há formação de AGNE que, por sua vez, é metabolizado pelo fígado. Quando a capacidade hepática de oxidar AGNE é superada, ocorre a formação de corpos

cetônicos, como o beta-hidroxibutirato (BHB), que leva a supressão na liberação de GnRH pelo hipotálamo (SMITH *et al.*, 1997).

Entre as ações da insulina está a redução na produção de AGNE e, conseqüentemente, de BHB pelo fígado, o que reflete no funcionamento do eixo reprodutivo. A insulina estimula a lipogênese, inibe a lipólise e aumenta o uso de corpos cetônicos em tecidos periféricos (BROCKMAN, 1982). Altas concentrações de insulina no pós-parto antecipam a primeira ovulação de vacas leiteiras de alta produção (BEAM, S W; BUTLER, 1998). Sabe-se ainda que a insulina estimula a proliferação *in vitro* das células da granulosa e da teca (ALVAREZ *et al.*, 2000; SPICER, LEON J; CHAMBERLAIN; MACIEL, 2002). Em bovinos, a administração de insulina aumenta a concentração sérica de IGF-1 (GONG *et al.*, 2002), tamanho dos folículos e taxa de ovulação (COX *et al.*, 1987).

Em contrapartida, concentrações excessivas de insulina podem levar a um quadro de resistência e perda de fertilidade em vacas. A resistência à insulina ocorre quando há redução na sensibilidade dos tecidos para responder as concentrações normais de insulina (BOURAHALFON; ZICK, 2009). Ela pode ser subdividida em duas formas distintas: capacidade de resposta à insulina e sensibilidade à insulina, podendo ocorrer separadamente ou concomitantemente. A redução da capacidade de resposta à insulina representa o deslocamento para baixo da curva de dose-resposta da insulina. Já a diminuição na sensibilidade à insulina consiste no desvio para a direita da curva de dose-resposta da insulina, ou seja, alta dose de insulina é necessária para produzir resposta de metade-máxima na concentração de glicose no sangue (BOSSAERT *et al.*, 2009; KAHN, 1978; OIKAWA; OETZEL, 2006). Embora os mecanismos intrínsecos envolvidos na diminuição da qualidade do oócito causada pelo excesso de energia na dieta sejam desconhecidos, a exposição prolongada a dietas com alto valor energético (>60 dias) parece ser necessária para afetar negativamente a qualidade do oócito (SALES *et al.*, 2016). Alguns estudos demonstraram que animais com hiperinsulinemia crônica desenvolvem resistência periférica à insulina, o que compromete o mecanismo de captação de glicose e leva à apoptose celular (CHI; SCHLEIN; MOLEY, 2000; PANTALEON; KAYE, 1996). Além disso, o excesso de energia altera a expressão de genes ligados ao metabolismo da glicose e estresse oxidativo, o que pode interferir com a qualidade oocitária (WRENZYCKI *et al.*, 2001).

Em relação a atuação da insulina no metabolismo oocitário, alguns estudos mostram que o receptor de insulina está presente nas células do cumulus e no oócito, no entanto, o

estímulo de captação da glicose pela insulina é maior nas células do cumulus (PURCELL; CHI; MOLEY, 2012). Sabe-se que o piruvato, fornecido pelas células do cumulus, é o substrato de preferência para obtenção de energia pelo oócito, porém, o maquinário necessário para o metabolismo da glicose propriamente dita já foi descrito também nessas células (RIEGER; LOSKUTOFF, 1994; SAITO; HIROI; KATO, 1994; URNER; SAKKAS, 1999). A expressão de GLUTs já foi identificada em oócitos de ratos (MORITA *et al.*, 1992), vacas (AUGUSTIN *et al.*, 2001), ovelhas (PISANI *et al.*, 2008), humanos (DAN-GOOR *et al.*, 1997) e macacos (ZHENG; VASSENA; LATHAM, 2007), mas, apesar de existirem poucos estudos em relação ao mecanismo de captação da glicose pelo oócito, já foi descrito que em oócitos de ratos existe expressão de GLUT1, 3 e 8, mas não foi detectada a expressão de GLUT4 (WANG, Q. *et al.*, 2012).

#### **2.3.4. Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1)**

Metabólitos e hormônios metabólicos podem ser considerados como mediadores dos efeitos da nutrição na função reprodutiva (KEISLER; LUCY, 1996; WETTEMANN; BOSSIS, 2000). Diversos autores associaram baixas concentrações de IGF-1 com o aumento do intervalo entre partos em vacas de corte (NUGENT *et al.*, 1993; ROBERTS *et al.*, 1997) e atraso ao início da puberdade (GRANGER *et al.*, 1989), entretanto, o papel do IGF-1 na regulação do retorno à ovulação pós-parto ainda não está bem estabelecido (STAGG *et al.*, 1998; WETTEMANN; BOSSIS, 2000).

Em um estudo realizado por Stagg *et al.* (1998), foi observado que as concentrações séricas de IGF-1 aumentaram linearmente até o dia da primeira ovulação em vacas de corte lactantes. Usando o modelo de restrição alimentar para novilhas, Bossis *et al.* (2000) (WETTEMANN; BOSSIS, 2000) relataram uma queda linear na concentração plasmática de IGF-1 desde o início da dieta até surgimento do anestro. Durante a dieta de realimentação, a concentração de IGF-1 aumentou linearmente até o retorno da ovulação.

Strauch *et al.* (2001) relataram que primíparas de corte sob suplementação com proteína não degradável no rúmen apresentaram maiores concentrações de IGF-1 comparado ao grupo controle (117,5 vs 92,4 ng/mL), independente de ECC ou peso corporal. Quando

realizada análise de regressão, observou-se que o aumento de 1 ng/mL no IGF-1 (Grupo PNDR e controle) no momento do parto ( $P < 0,05$ ) e durante o período pós-parto ( $P < 0,01$ ) correspondeu a decréscimo de 0,13 dia no intervalo pós-parto. Cumulativamente, esses estudos sugerem que o mecanismo do retorno ao cio no pós-parto, assim como a retomada da ciclicidade após um período de restrição dietética e realimentação, é pelo menos parcialmente mediada pelo IGF-1 (STAGG *et al.*, 1998).

Os potenciais pontos de ação e o exato mecanismo no qual o IGF-1 afeta as funções reprodutivas não são claros. Aumento na concentração de IGF-1 pode estimular diretamente a proliferação ou a capacidade esteroidogênica das células da teca (ALVAREZ *et al.*, 2000; SPICER, L.J.; STEWART, 1996) ou da granulosa (SPICER, L. J.; ALPIZAR; ECHTERNKAMP, 1993), ou afetar diretamente a função da hipófise (SOLDANI *et al.*, 1995; WILSON, 1995) e do hipotálamo (HINEY; OJEDA; DEES, 1991).

Está documentado, por estudos de cultura *in vitro* (SPICER, L.J.; STEWART, 1996; STEWART *et al.*, 1996), que o IGF-1 aumenta o número de sítios de ligação de LH e aumenta também a produção de progesterona e androstenediona pelas células da teca, estimulada pelo LH. Isto sugere que o IGF-1 tem um papel no aumento da capacidade de resposta das células foliculares ao LH, que por sua vez aumenta a produção de estradiol folicular, que é um pré-requisito para que ocorra a ovulação.

Cooke *et al.* (2013) realizaram um experimento a fim de avaliar o impacto do IGF-1 e leptina circulantes na puberdade de novilhas *Bos taurus* utilizando como metodologia a administração de rbST a cada 14 dias para simular diferentes concentrações de IGF-1 e leptina. Observou-se que novilhas com elevadas concentrações circulantes de IGF-1 atingiram a puberdade mais precocemente, independente da taxa de crescimento, manejo nutricional, conteúdo de gordura corporal e concentração circulante de leptina. Em revisão feita por Thatcher *et al.* (2006), foi descrito que, em vacas de leite, a queda de estrógeno após o parto diminui o efeito supressivo na secreção de FSH e a estimulação ovariana e crescimento folicular podem ser iniciados próximo aos sete dias pós parto. No entanto, em algumas situações, o folículo dominante subsequente pode não ser ativo na produção de estrógeno, o que impede a ovulação. Essa situação ocorre provavelmente pelas baixas concentrações circulantes de LH e IGF-1, que diminuem a capacidade esteroidogênica das células da teca e da granulosa e, conseqüentemente, a fertilidade. Em contrapartida, os autores dessa mesma revisão descreveram que, em vacas leiteiras submetidas a administração de bST,

concentrações de IGF-1 acima e abaixo da média considerada como ideal pelos autores, pode diminuir a taxa de prenhez e a fertilidade desses animais.

### **2.3.5. Ácidos graxos não esterificados (AGNE)**

Durante o balanço energético negativo (BEN) no início da lactação, a adaptação primária do metabolismo é a mobilização de reservas de gordura corporal para atender as necessidades globais de energia do organismo (FILHO, A. E. *et al.*, 2010). A gordura corporal é mobilizada para a corrente sanguínea na forma de ácidos graxos não esterificados (AGNEs). Estes, por sua vez, são mobilizados principalmente pelo fígado e oxidados na mitocôndria para produzir energia ou são exportados na forma de lipoproteínas de baixa densidade. O sistema músculo esquelético também utiliza os AGNEs como fonte energética, diminuindo a dependência de glicose durante o início da lactação. Em razão a elevação da concentração circulante de AGNE em resposta ao aumento da demanda de energia associado ao baixo consumo alimentar, a ingestão de matéria seca e AGNEs geralmente estão inversamente correlacionado (LIMA, 2013).

Os AGNEs, no início da lactação garantem a energia para a produção do leite, pois auxiliam no fornecimento de energia para diferentes tecidos, priorizando a utilização de glicose e aminoácidos para a glândula mamária (CHILLIARD; BOCQUIER; DOREAU, 1998). Porém, quando a mobilização de AGNE supera a capacidade hepática de metabolização, ocorre a produção de corpos cetônicos, principalmente do beta-hidroxibutirato desencadeando desta forma, o quadro de cetose (LOOR *et al.*, 2006). Concomitante as alterações nas concentrações desses metabólitos ocorre redução na pulsatilidade de LH, demonstrando que nesse contexto metabólico, a retomada da ciclicidade no pós parto recente de vacas pode ser negativamente afetada (DICOSTANZO; WILLIAMS; KEISLER, 1999).

### **2.3.6. Colesterol**

O controle do crescimento folicular em ruminantes depende de uma série de fatores que atuam tanto no ovário quanto no sistema nervoso central, mais especificamente no hipotálamo e na hipófise (LEE *et al.*, 2001). Dentre estes fatores está a nutrição, que pode influenciar o desenvolvimento folicular e a qualidade oocitária (PFEIFER *et al.*, 2009). Há evidências de que pequenas mudanças no plano alimentar ou variações individuais no consumo podem afetar a dinâmica folicular, mesmo sem alterar a concentração sérica de gonadotrofinas hipofisiárias. Neste âmbito, o estudo da interação de alguns marcadores metabólicos com hormônios da reprodução e função ovariana se torna interessante. Um bom candidato é o colesterol, que é precursor dos hormônios esteróides e está indiretamente relacionado com a regulação do eixo hipotálamico-hipofisiário e da foliculogênese, podendo afetar a fertilidade dos animais (GRUMMER, R.; CARROLL, 1991).

O colesterol pode influenciar na performance reprodutiva dos bovinos, por ser precursor de hormônios esteróides importantes como a progesterona (GODOY *et al.*, 2004). Baixa concentração sanguínea de colesterol leva a uma diminuição também na sua concentração ovariana, podendo prejudicar a esteroidogênese (GODOY *et al.*, 2004). A maioria do colesterol sanguíneo é transportada por lipoproteínas de alta (HDL) e baixa densidade (LDL), que são captadas pelo tecido ovariano para a produção destes hormônios (GRUMMER, R. R.; CARROLL, 1988).

O aumento no colesterol de vacas zebuínas no pós parto pode estar associado à mobilização de reservas corporais para atender a demanda de nutrientes para lactação e manutenção, principalmente em vacas que diminuem o ECC no pós-parto (RUAS *et al.*, 2000). Também nas vacas holandesas em lactação, o colesterol sérico pode aumentar no pós-parto, à medida que ocorre perda de ECC (GODOY *et al.*, 2004).

Mancio *et al.* (1999) definiram que as dietas hiperlipídicas aumentaram as concentrações de progesterona, colesterol e HDL em novilhas. A correlação entre as concentrações de progesterona e as de HDL e colesterol, do 6<sup>o</sup> ao 18<sup>o</sup> dia após o estro é indicativa de que tais metabólitos lipídicos podem aumentar o efeito da nutrição na função luteal cíclica de novilhas. Porém, Delazari *et al.* (2000) em experimento semelhante utilizando vacas mestiças Holandês/Gir, confirmaram o aumento do colesterol total e colesterol HDL, sem aumento nas concentrações de progesterona e desempenho reprodutivo. Wehrman *et al.* (1991) realizaram experimentos com vacas de corte no período pós-parto e mostraram que o aumento de lipídeos no sangue, em decorrência do uso de 1,5 kg de semente de algodão na

dieta, provocou aumento na concentração de colesterol total, não causando, no entanto, elevação dos níveis de triglicérides, durante as três primeiras semanas após o parto. A suplementação com dieta rica em lipídeos durante trinta dias, iniciando aos 28 dias pós-parto, aumentou em 18% a incidência de atividade luteal.

Schrick *et al.* (1990) verificaram que a explicação para a não manutenção da ciclicidade ovariana em vacas submetidas a estresse nutricional, pode ser a diminuição da insulina, o que resulta em diminuição da captação da glicose pelo ovário, privando, portanto, as células da energia necessária para a atividade esteroidogênica durante o ciclo estral seguinte, ou então, essa diminuição da insulina resultaria em queda do número de receptores ao LH nas células luteínicas, diminuindo assim a habilidade das mesmas em sintetizar progesterona. Da mesma forma, atribui-se papel de importância nesse processo ao colesterol, pois fêmeas submetidas à restrição energética mostraram baixa concentração de colesterol, associada a menores concentrações de progesterona sérica.

## **2.4.Fertilidade**

### **2.4.1. Qualidade oocitária**

Sabe-se que a fertilidade das fêmeas é em grande extensão determinada pela qualidade do oócito, a qual é refletida na sua habilidade de progredir a meiose, ser fertilizado e possibilitar o desenvolvimento de um embrião viável. Os estudos da expressão de fatores secretados localmente pelos oócitos e pelas células do cumulus são essenciais para o entendimento adequado da maturação oocitária e podem ser importantes para auxiliar a compreensão da reduzida qualidade gamética em vacas primíparas (BOTTINO, 2014).

O crescimento do oócito dentro da estrutura folicular é de fundamental importância na aquisição de sua capacidade em completar a meiose, ser fertilizado e sofrer as clivagens do desenvolvimento embrionário inicial. O processo de crescimento e maturação do gameta feminino mamífero é surpreendentemente lento, sendo que em humanos pode levar até alguns meses desde o recrutamento do folículo primordial ao conjunto de folículos em crescimento. Durante este período, o oócito se expande, sofre a quebra da vesícula germinativa e reinicia o

processo de meiose (GOUGEON, 1996). Paralelamente a expansão do volume celular, a célula germinativa acumula água, lipídios e íons e tanto a taxa de síntese proteica como o acúmulo de proteínas também sofrem aumento considerável.

O desenvolvimento completo do oócito dentro da estrutura folicular exige uma comunicação bidirecional constante entre o oócito e as células da granulosa. Esta comunicação é alcançada através da manutenção de junções comunicantes tipo *gap* que ligam as células da granulosa entre si e com o oócito (ANDERSON; ALBERTINI, 1976). Estas junções são mantidas ao longo de toda fase de crescimento até pouco antes da retomada da meiose, quando os processos entre o oócito e as células da granulosa são recolhidos, de forma a impedir a passagem de metabólitos e moléculas informacionais.

Dois importantes fatores secretados pelo oócito são o fator de crescimento diferencial 9 (GDF9) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15), os quais ativam vias sinalizadoras nas células do *cumulus* para regular genes chaves e processos celulares importantes para diferenciação e para manutenção de seu próprio fenótipo (revisado por GILCHRIST; LANE; THOMPSON, 2008). Recentemente, um estudo evidenciou que BMP15 e FGF10 aumentaram a expansão do cumulus *in vitro* pela modulação da abundância de mRNA de *PTGS2* ou genes correlatos e que ambos os fatores aumentaram o metabolismo de glicose pela via da hexosamina (CAIXETA *et al.*, 2013). Esses dados reforçam a importância desses fatores na maturação e, conseqüentemente, na competência oocitária de desenvolvimento. Além disso, deficiências na secreção de GDF9 e BMP15 pelo oócito resultam em desenvolvimento folicular anormal e infertilidade (GALLOWAY *et al.*, 2000; JINWEN DONG, DAVID F ALBERTINO, KATSUHIKO NISHIMORI, T RAJENDRA KUMAR, NAIFANG LU, 1996; YAN *et al.*, 2001). Em bovinos, a adição de fatores secretados pelo oócito ao meio de MIV, seja pelo co-cultivo de CCOs intactos com oócitos desnudos, seja pela adição de GDF9 e BMP15 recombinante ao meio com os CCOs, aumentou o potencial de desenvolvimento a blastocisto e melhorou a qualidade dos embriões produzidos, conforme evidenciado pelo aumento do número de células totais e do trofotoderma (HUSSEIN; THOMPSON; GILCHRIST, 2006).

Sabe-se também que os fatores de crescimento folicular (follicular growth factors; FGFs) controlam facetas específicas da foliculogênese. Em camundongos, por exemplo, o FGF8 derivado de oócitos atua conjuntamente com a BMP15 para estimular a glicólise nas células do cumulus (SUGIURA *et al.*, 2008). Em ratos e humanos, o FGF2 induz o

crescimento dos folículos primordiais ovarianos (GAROR *et al.*, 2009; NILSSON; PARROTT; SKINNER, 2001). Em oócitos de bovinos, já foi demonstrada a expressão de diversos transcritos de FGF, dentre eles o FGF8, 10 e 17. A importância dos FGFs durante os estágios finais de maturação oocitária foi demonstrada em dois estudos mais recentes (ZHANG, K.; EALY, 2012; ZHANG, KUN; HANSEN; EALY, 2010). Neles, tanto o bloqueio da atividade de receptores de FGF quanto o bloqueio da ação do FGF10 endógeno ou exogenamente suplementado não afetou as taxas de fertilização, mas reduziu as taxas de desenvolvimento embrionário subsequentes. Além disso, a suplementação com FGF10 durante a MIV aumentou o número de embriões com mais de 8 células no terceiro dia após fertilização e de blastocistos no sétimo, apesar de não ter alterado as taxas de fertilização (ZHANG, KUN; HANSEN; EALY, 2010). Os mecanismos exatos pelos quais os FGFs aumentam a competência oocitária durante a MIV ainda são incertos, porém acredita-se que sua atuação seja via células do cumulus, promovendo a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário anterior à ativação do genoma do embrião (o que ocorre entre o segundo e o terceiro dia após a fecundação em bovinos).

Um dos estágios finais do desenvolvimento do oócito é a maturação. Essa fase se estende desde a reentrada em meiose que ocorre pouco antes da ovulação, até a subsequente fertilização (ALBERTINI *et al.*, 2001; ALBERTINI; JO, 1998). Um número de genes-chave foi identificado, os quais são expressos pelas células do cumulus durante a fase de maturação e cujos modelos *knock-out* resultam em infertilidade. Estes genes incluem: HAS2 (sintetase 2 do ácido hialurônico), TNFAIP6 (proteína 6 induzida pelo fator de necrose tumoral alfa) e PTX3 (pentraxin 3), responsáveis pela síntese e estabilização da matriz do cumulus, PTGS2 (sintetase responsável pela síntese de prostaglandinas) e GREMLIN (uma proteína ligadora da proteína morfogenética do osso 15, BMP15). Estes genes englobam uma série de funções das células do cumulus, desde os estágios finais da maturação do oócito, antes do pico de LH (GREMLIN) até a resposta inicial ao sinal ovulatório (PTG2) e durante a ovulação (a qual requer a expressão de TNFAIP6 pelo cumulus) e a estabilidade do cumulus durante a fertilização e transporte no oviduto (PTX3). Assim, estes e outros genes expressos pelas células do cumulus tanto refletem como determinam a interação entre cumulus e oócito e o embrião inicial (RUSSELL; ROBKER, 2007).

#### **2.4.2. Expressão gênica no complexo cumulus-oócito (CCO)**

A qualidade e a capacidade de desenvolvimento oocitário podem estar relacionadas com a presença ou quantidade de genes específicos expressos durante o desenvolvimento inicial do oócito (BILODEAU-GOESEELS, 2003). Assim, a expressão de genes em oócitos e células do cumulus relacionados a importantes funções biológicas, como por exemplo proliferação celular (WANG, L. *et al.*, 2014), metabolismo lipídico (PACZKOWSKI *et al.*, 2013), estresse do retículo endoplasmático (YANG, X. *et al.*, 2012), estresse oxidativo (AMIN *et al.*, 2014) e apoptose (LI, H. J. *et al.*, 2009) tem sido utilizada como possíveis indicadores de qualidade oocitária.

A expansão das células do cumulus relaciona-se positivamente com a maturação oocitária e fertilização (TANGHE *et al.*, 2002) e a expressão de genes específicos (HAS2, PTX3 e TNFAIP6) determinam a capacidade de expansão dessas células (FULOP *et al.*, 1997; GEBHARDT *et al.*, 2011; PANGAS; JORGEZ; MATZUK, 2004; VARANI *et al.*, 2002). O gene HAS2 (hyaluronan synthase 2) é responsável pela síntese de ácido hialurônico pelas células do cumulus, promovendo a expansão da matriz extracelular (IRVING-RODGERS; RODGERS, 2005; SCHOENFELDER; EINSPANIER, 2003), interferindo diretamente na competência do oócito (DUNNING *et al.*, 2007).

Trabalhos mostram que altos conteúdos lipídicos podem provocar estresse celular mediante o estresse do retículo endoplasmático, e já se sabe que esse mecanismo repercute negativamente na fertilidade (WU *et al.*, 2010; YANG, X. *et al.*, 2012). Os lipídeos maioritários nos oócitos e embriões são os triacilgliceróis (TAG), frequentemente localizados em gotas lipídicas no citoplasma (FERGUSON; LEESE, 1999). Os TAG são formados na membrana do retículo endoplasmático (RE) na forma de gotas lipídicas (MARCHESAN *et al.*, 2003). Alguns genes estão envolvidos no acúmulo lipídico durante a maturação de oócitos bovinos, como por exemplo a proteína ligadora de ácidos graxos 3 (Fatty Acid Binding Protein 3 - FABP3), o PLIN2 e o SREBP1 (BARRONDO, 2017).

As “PAT Proteins” são proteínas localizadas ao redor da gota lipídica entre elas a encontra-se a Perilipina 2 (PLIN2). Essa proteína é relacionada com o tamanho e a quantidade das gotas lipídicas na célula, e está envolvida na limitação da interação entre lipases e gotas lipídicas (BICKEL; TANSEY; WELTE, 2009). O fator de transcrição SREBP1 (sterol regulatory element binding proteins 1) está envolvido no controle da expressão de varias

enzimas relacionadas com a síntese de ácidos graxos e TAG, como a acetil-Coa descarboxilase (ACACA) a ácido graxo sintetase (FASN), entre outras, e portanto está diretamente envolvido na lipogênese (SUZUKI; MIYOSHI; ISEMURA, 2012).

Sabe-se ainda que o aumento de lipídeos provoca nas células um estresse do retículo endoplasmático (RE). Foi verificada a relação entre altas quantidades de lipídeos no fluido folicular com o estresse do RE nos oócitos, e consequentemente com as baixas taxas de maturação e fertilidade (WU *et al.*, 2010; YANG, X. *et al.*, 2012). Se a célula não consegue combater esse estresse, ativa-se na célula a via de morte celular programada a partir do retículo endoplasmático (BRAVO *et al.*, 2012; MALHOTRA; KAUFMAN, 2007). A via de apoptose celular tem seu início com a ativação de duas quinases, IRE1 e PERK, e um fator de transcrição, a ATF6. O PERK e ATF6 estimularão a ativação transcricional do CHOP10 (MA *et al.*, 2002). O CHOP10 induzirá a apoptose mediante ativação de genes apoptóticos (GADD34, DR5, TRB3) e inibição da expressão dos anti-apoptóticos (BCL2). Nesta situação, haverá liberação dos estoques de  $Ca^{+2}$  para o citoplasma. O  $Ca^{+2}$ , na mitocôndria, induz a depolarização da membrana, a geração de novas espécies reativas de oxigênio (EROs), a ativação da caspase 9 (MALHOTRA; KAUFMAN, 2007). O IRE1 ativará também a via da caspase 12, que juntamente com a caspase 9 determinarão a apoptose celular (YONEDA *et al.*, 2001).

Além do acúmulo lipídico, o estresse do RE pode ser consequência e/ou causa do estresse oxidativo celular. Chama-se de estresse oxidativo quando a célula não possui antioxidantes suficientes para neutralizar EROs geradas pela célula. As EROs são geradas de forma fisiológica durante a respiração celular, quando o oxigênio molecular (dioxigênio,  $O_2$ ) é reduzido por elétrons liberados formando o superóxido  $O_2^-$ . A partir daí o superóxido pode ser derivado em outras moléculas formando várias EROs como o HO ou  $H_2O_2$  (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010). Em todas as células existem antioxidantes que revertem essa situação. No caso do oócito e embrião, o antioxidante maioritário é a glutatona reduzida (GSH) (EICHENLAUB-RITTER *et al.*, 2011). Recentemente se tem verificado a relação positiva entre oócitos e embriões que possuem genes antioxidantes que combatem o estresse oxidativo e sua competência. Alguns exemplos são: NRF2, SOD1 e SOD2 (AMIN *et al.*, 2014).

A proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), conhecida como ERK (quinase regulada por sinal extracelular), também controlada pela alta concentração do AMPc,

promove a estabilização do fator promotor de maturação (MPF) nos oócitos e progressão da meiose (VIGNERON *et al.*, 2004). A ativação da MAPK ocorre com a proximidade do rompimento da VG, com 7-8 horas após o cultivo *in vitro* e apresenta aumento gradual até 12-14 horas de maturação, sugerindo que sua ação não é requerida para o reinício da meiose, mas essencial em eventos pós-rompimento da vesícula germinativa (KUBELKA *et al.*, 2000).

A apoptose é um processo de morte celular ativo (FRANCO; CIDLOWSKI, 2009), que pode ser iniciado por duas vias distintas: extrínseca e intrínseca. A via intrínseca tem como característica a liberação de fatores próapoptóticos, tais como o citocromo c, pela mitocôndria. O citocromo c livre no citosol ativa caspases, ocasionando proteólise e morte celular. Já a via extrínseca é desencadeada pela relação de alguns ligantes a receptores de morte na superfície celular, como o receptor do fator de necrose tumoral I (TNFR1), induzindo o recrutamento e a ativação de caspase e ativação da BAX, desencadeando a liberação de fatores apoptóticos pela mitocôndria. Por outro lado, existem outras proteínas conhecidas como anti-apoptóticas, como a BCL-2, que antagonizam esses efeitos (ZONG *et al.*, 2001), por meio de um bloqueio da ação de BAX e BAK, mantendo a integridade da membrana mitocondrial (PERCIAVALLE *et al.*, 2012). A família do gene BCL2 (B cell leukemia/lymphoma 2) é uma das reguladoras centrais da apoptose. Essa família pode ser composta por proteínas pró-apoptóticas, como a BAX (BCL2 associated X protein) e anti-apoptóticas, como a BCL2 (GROSS; MCDONNELL; KORSMEYER, 1999). A relação BAX/BCL2 determina a susceptibilidade da célula a apoptose (OLTVAI; MILKMAN; KORSMEYER, 1993). Oócitos em grau I e blastocistos possuem maior expressão de BCL2 do que de BAX (YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, 2002).

Os processos de ativação folicular e desenvolvimento oocitário são regulados pela via de sinalização PI3K/AKT (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B) (LIU *et al.*, 2007; REDDY *et al.*, 2008). O gene PI3K é anti-apoptótico e está envolvido na ativação do folículo primordial e regulação da proliferação, sobrevivência, migração e metabolismo oocitário (CANTLEY, 2002; JOHN *et al.*, 2009). Já o PTEN (phosphatase and tensin homolog) é uma fosfatase lipídica específica do oócito que funciona como regulador negativo do PI3K. Na ausência do PTEN, os oócitos de toda reserva de folículos primordiais de camundongos fêmeas sofreram ativação, demonstrando a atuação do PTEN como supressor da ativação folicular (CASTRILLON *et al.*, 2003). A via de regulação PI3K-Akt possui diversas funções, incluindo a estimulação da atividade da Akt através de sua fosforilação como resultado do estímulo pelo PI3K e supressão pelo PTEN. O FOXO3 é membro da subfamília FOXO de

fatores de transcrição cujos membros são reguladores negativos do padrão PI3K/AKT/PTEN (TRAN *et al.*, 2003). Além disso, o FOXO3, substrato da AKT, é um fator transcricional que leva à apoptose e parada do ciclo celular. Estudos conduzidos em camundongos fêmeas e em ratas demonstraram que enquanto o AKT estimula o desenvolvimento do oócito, o FOXO3 inibe essa ação (ACCILI; ARDEN, 2004; REDDY *et al.*, 2005).

## REFERÊNCIAS

- ACCILI, D.; ARDEN, K. C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. **Cell**, v. 117, n. 4, p. 421–426, 2004.
- AHMADZADEH, A.; BARNES, M. A.; PEARSON, R. E. EFFECT OF NALOXONE ON SERUM LUTEINIZING HORMONE CONCENTRATION IN ANOVULATORY HOLSTEIN COWS DURING THE EARLY POSTPARTUM PERIOD. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, n. 3, p. 177–181, 1998.
- AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species , oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **The International Journal of Biochemestri and Cell Biology**, v. 42, p. 1634–1650, 2010.
- ALBERTINI, D. F. *et al.* Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, p. 647–653, 2001.
- ALBERTINI, D. F.; JO, M. Comparative aspects of meiotic cell cycle control in mammals. **J Mol Med**, v. 76, p. 795–799, 1998.
- ALVAREZ, P. *et al.* Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 5, p. 1291–1302, 2000.
- AMIN, A. *et al.* Bovine Embryo Survival Under Oxidative-Stress Conditions is Associated With Activity of the NRF2-Mediated Oxidative-Stress-Response Pathway. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, p. 497–513, 2014.
- ANDERSON, E.; ALBERTINI, D. F. Gap Junctions between the Oocyte and Companion Follicle Cells in the Mammalian Ovary. **Journal of Cell Biology**, v. 71, n. 2, p. 680–686, 1976.
- ASBIA. **Index ASBIA**. . [S.l.]: ASBIA. , 2017
- AUGUSTIN, R. *et al.* Glucose Transporter Expression Is Developmentally Regulated in In Vitro Derived Bovine Preimplantation Embryos. **Molecular Reproduction and**

**Development**, v. 60, p. 370–376, 2001.

AYRES, H. *et al.* Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. **Livestock Science**, v. 123, n. 2–3, p. 175–179, ago. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871141308003478>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

AZEVEDO, R. A. DE; COELHO, S. G. Resistência à insulina no período de transição de vacas leiteiras. **Nutritime**, v. 13, n. 6, p. 4895–4901, 2016.

BARASH, I. A. *et al.* Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology**, v. 137, n. 7, p. 3144–3147, 1996.

BARRONDO, M. D. C. Metabolismo lipídico e estresse celular durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário in vivo e in vitro em bovinos. 2017. 1-224 p. **USP-FZEA**, 2017.

BARUSELLI, P. S. *et al.* History , evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 139–152, 2012.

BARUSELLI, P. S. *et al.* Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. **III Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Proceedings**, v. 3, p. 146–167, 2008.

BARUSELLI, P. S. *et al.* The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal reproduction science**, v. 82–83, p. 479–86, jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271474>>. Acesso em: 26 fev. 2014.

BASTIDAS, P. *et al.* BIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL LUTEINIZING HORMONE ACTIVITY AND BLOOD METABOLITES IN POSTPARTUM BRAHMAN COWS. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 2771–2778, 1990.

BASTOS, G. M. *et al.* Hormonal induction of ovulation and artificial insemination in suckled beef cows under nutritional stress. **Theriogenology**, v. 62, n. 5, p. 847–53, 1 set. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15251236>>. Acesso em: 7 abr. 2014.

BAUMAN, D. E.; BRUCE CURRIE, W. Partitioning of Nutrients During Pregnancy and Lactation: A Review of Mechanisms Involving Homeostasis and Homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 9, p. 1514–1529, 1980. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030280831110>>.

BEAM, S. W.; BUTLER, W. R. Energy Balance, Metabolic Hormones, and Early Postpartum Follicular Development in Dairy Cows Fed Prilled Lipid. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 1, p. 121–131, 1998. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75559-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75559-6)>.

BEAM, S. W.; BUTLER, W. R. Energy Balance and Ovarian Follicle Development Prior to the First Ovulation Postpartum in Dairy Cows Receiving Three Levels of Dietary Fat. **Biology of reproduction**, v. 56, p. 133–142, 1997.

BICKEL, P. E.; TANSEY, J. T.; WELTE, M. A. PAT proteins , an ancient family of lipid

droplet proteins that regulate cellular lipid stores. **Biochimica et Biophysica ACTA**, v. 1791, n. 6, p. 419–440, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2009.04.002>>.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effect of oocyte quality on the relative abundance of specific gene transcripts in bovine mature oocytes and 16-cell embryos. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, p. 151–156, 2003.

BISHOP, D. K.; WETTEMANN, R. P.; SPICER, L. J. Body Energy Reserves Influence the Onset of Luteal Activity After Early Weaning of Beef Cows. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2703–2708, 1994.

BÓ, G. A. *et al.* Effect of progestogen plus estradiol-17B treatment on superovulatory response in beef cattle. **Theriogenology**, v. 45, n. 96, p. 897–910, 1996.

BÓ, G. A. *et al.* THE CONTROL OF FOLLICULAR WAVE DEVELOPMENT FOR SELF-APPOINTED EMBRYO TRANSFER PROGRAMS IN CATTLE. **Theriogenology**, v. 57, p. 53–72, 2002.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 307–326, out. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432003000976>>. Acesso em: 26 fev. 2014.

BOSSAERT, P. *et al.* Differences in the glucose-induced insulin response and the peripheral insulin responsiveness between neonatal calves of the Belgian Blue , Holstein-Friesian , and East Flemish breeds. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 9, p. 4404–4411, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2218>>.

BOSSAERT, P. *et al.* Interrelations Between Glucose-Induced Insulin Response , Metabolic Indicators , and Time of First Ovulation in High-Yielding Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 9, p. 3363–3371, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-0994>>.

BOSSIS, I. *et al.* Nutritionally induced anovulation in beef heifers: Ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 6, p. 1536–1546, 2000.

BOTTINO, M. P. Efeito da suplementação com gonadotrofinas no crescimento final do folículo e na fertilidade de vacas *Bos indicus* submetidas à IATF. 2014. 1-48 p. Dissertações **Universidade Federal de Lavras**, 2014.

BOURA-HALFON, S.; ZICK, Y. Phosphorylation of IRS proteins , insulin action , and insulin resistance. **Am J Physiol Endocr Metab**, v. 296, p. 581–591, 2009.

BRAVO, R. *et al.* Endoplasmic reticulum : ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 44, n. 1, p. 16–20, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.012>>.

BROCKMAN, R. Insulin and glucagon responses in plasma to intraportal infusions of propionate and butyrate in sheep. **Comp Biochem Physiol**, v. 73A, n. 2, p. 237–238, 1982.

BURKE, C. R.; MACMILLAN, K. L.; BOLAND, M. P. Oestradiol potentiates a prolonged

progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomised cows. **Animal reproduction science**, v. 45, n. 96, p. 13–28, 1996.

BUTLER, W. R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 449–457, 2000.

CAIXETA, E. S. *et al.* Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. **Reproduction**, v. 146, n. 1, p. 27–35, 2013.

CAMPBELL, B. *et al.* Enhanced Response of Granulosa and Theca Cells from Sheep Carriers of the FecB Mutation in Vitro to gonadotropins and bone morphogenetic protein-2, -4, and -6. **Endocrinology**, v. 147, n. 4, p. 1608–1620, 2006.

CANTLEY, L. C. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. **Science**, v. 296, n. 1655, p. 1–4, 2002.

CASTRILLON, D. H. *et al.* Suppression of Ovarian Follicle Activation in Mice by the Transcription Factor Foxo3a. **Science**, v. 301, n. 215, p. 1–5, 2003.

CATUNDA, A. G. V. *et al.* O papel da leptina na reprodução dos ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 1, p. 3–9, 2014.

CHI, M. M. Y.; SCHLEIN, A. L.; MOLEY, K. H. Concentrations Trigger Apoptosis in the Mouse Blastocyst via Down-Regulation of the IGF-1 Receptor. **Endocrinology**, v. 141, n. 12, p. 4784–4792, 2000.

CHILLIARD, Y.; BOCQUIER, F.; DOREAU, M. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. **Reprod. Nutr. Dev.**, n. 38, p. 131–152, 1998.

CONNOR, H. C. *et al.* Effect of dietary energy, body condition and calf removal on pituitary gonadotropins, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic opioids in beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 7, n. 3, p. 403–411, 1990.

COOKE, R. F. *et al.* Effects of bovine somatotropin administration on growth, physiological, and reproductive responses of replacement beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 2894–2901, 2013. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84904615442&partnerID=40&md5=8be9d77d02c86e27d81d693d547656d4>>.

COX, N. *et al.* Enhancement of ovulation rate in gilts by increasing dietary energy and administering insulin during follicular growth. **Journal of Animal Science**, v. 64, p. 507–516, 1987.

CUNHA, A. P. **Fertilidade em vacas de corte após restrição da amamentação e suplementação energética.** 2003. 1-67 p. UFPR, 2003.

CUTAIA, L. *et al.* Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). **Theriogenology**, v. 59, n. abstract, p. 216, 2003.

DAN-GOOR, M. *et al.* Expression of glucose transporter and glucose uptake in human oocytes and preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v. 12, n. 11, p. 2508–2510, 1997.

DELAZARI, J. A. *et al.* Desempenho Reprodutivo , Concentrações de Progesterona e Metabólitos Lipídicos no pós parto de vacas mestiças H/Z, submetidas a uma dieta hiperlipidêmica. **Rev Bras Zootec**, v. 29, n. 2, p. 413–420, 2000.

DEROUEEN, S. M. *et al.* Humes and B B Greene Prepartum Body Condition and Weight Influences on Reproductive Performance of First-Calf Beef Cows '. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1119–1125, 1994a.

DEROUEEN, S. M. *et al.* Prepartum Body Condition and Weight Influences on Reproductive Performance of First-Calf Beef Cows. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1119–1125, 1994b.

DHUYVETTER, D. V; CATON, J. S. Manipulation of reproduction and lactation with supplementation in beef cattle. Proceedings of the 3rd Grazing Livestock Nutrition Conference. [S.l.]: **Proceedings of the 3rd grazing livestock nutrition conference.** , 1996

DICOSTANZO, A.; WILLIAMS, J. E.; KEISLER, D. H. Effects of short-or long-term infusions of acetate or propionate on luteinizing hormone, insulin, and metabolite concentrations in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 11, p. 3050–3056, 1999.

DRANSFIELD, M. B. G. *et al.* Timing of Insemination for Dairy Cows Identified in Estrus by a Radiotelemetric Estrus Detection System. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 7, p. 1874–1882, 1998. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75758-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75758-3)>.

DUFFY, P. *et al.* The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 725–734, fev. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X03002553>>. Acesso em: 6 abr. 2014.

DUHLMEIER, R. *et al.* Mechanisms of insulin-dependent glucose transport into porcine and bovine skeletal muscle. **Am J Physiol Regul Comp Physiol**, v. 289, p. 187–197, 2005.

DUNNING, K. R. *et al.* Altered composition of the cumulus-oocyte complex matrix during in vitro maturation of oocytes. **Human Reproduction**, v. 22, n. 11, p. 2842–2850, 2007.

EICHENLAUB-RITTER, U. *et al.* Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. **Mitochondrion**, v. 11, n. 5, p. 783–796, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2010.08.011>>.

EMERICK, L. L. *et al.* Retorno da atividade ovariana luteal cíclica de vacas de corte no pós-parto : uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 203–212, 2009.

ESPINOZA, J. L.; JIMENEZ, J. A.; FLORES, A. Effects of Calcium Soaps of Fatty Acids on Postpartum Reproductive Activity in Beef Cows and Growth of Calves. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2888–2892, 1995.

- ESPOSITO, G. *et al.* Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. x, p. 1–12, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.11.007>>.
- FAJERSSON, P.; STANKO, R. L.; WILLIAMS, G. L. Distribution and Repeatability of Anterior Pituitary Responses to GnRH and Relationship of Response Classification to the Postpartum Anovulatory Interval of Beef Cows. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 3043–3049, 1999.
- FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocyte and early embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, p. 373–378, 1999.
- FILHO, A. E. *et al.* Balanço energético negativo. **Pubvet**, v. 4, n. 11, p. 1–45, 2010.
- FILHO, M. F. S. *et al.* Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore ( *Bos indicus* ) heifers. **Animal reproduction science**, v. 118, p. 182–187, 2010.
- FILHO, M. F. S. *et al.* Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol / progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 455–463, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.022>>.
- FORTUNE, J. E.; SIROIS, J.; QUIRK, S. M. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 95–109, 1988.
- FRANCO, R.; CIDLOWSKI, J. A. Apoptosis and glutathione : beyond an antioxidant. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 10, p. 1303–1314, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.107>>.
- FREETLY, H. C.; NIENABER, J. A.; BROWN-BRANDL, T. Partitioning of energy during lactation of primiparous beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 8, p. 2157–2162, 2006.
- FRIES, C. A. DE; NEUENDORFF, D. A.; RANDEL, R. D. Fat Supplementation Influences Postpartum Reproductive Performance in Brahman Cows. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 864–870, 1998.
- FULOP, C. *et al.* Coding sequence , exon – intron structure and chromosomal localization of murine TNF-stimulated gene 6 that is specifically expressed by expanding cumulus cell – oocyte complexes. **Gene**, v. 202, p. 95–102, 1997.
- GALLOWAY, S. M. *et al.* Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, n. 3, p. 279–283, 2000.
- GARCIA-WINDER, M. *et al.* Effects of Norgestomet on Follicular Development in Postpartum Beef Cows. **Journal of Animal Science**, v. 64, p. 1099–1109, 1987.
- GARCIA-WINDER, M.; LEWIS, P. E.; INSKEEP, E. K. Ovulation in Postpartum Beef Cows Treated with Estradiol. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 1–4, 1988.

- GAROR, R. *et al.* Effects of basic fibroblast growth factor on in vitro development of human ovarian primordial follicles. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 5 SUPPL., p. 1967–1975, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.04.075>>.
- GEARY, T. W. *et al.* Pregnancy rates of postpartum beef cows that were synchronized using Syncro-Mate-B or the Ovsynch protocol. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1523–1527, 1998.
- GEBHARDT, K. M. *et al.* Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 1, p. 47–52.e2, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.033>>.
- GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 2, p. 159–177, 2008.
- GINTHER, O. J. *et al.* Selection of the Dominant Follicle in Cattle <sup>2</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187–1194, 1996.
- GODOY, M. M. *et al.* Energy sources in low intake supplements on the productive and reproductive performance of Zebu cows. **Semina**, v. 36, n. 3, p. 1571–1582, 2015.
- GODOY, M. M. DE *et al.* Parâmetros Reprodutivo e Metabólico de Vacas da Raça Guzera Suplementadas no Pré e pós parto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 103–111, 2004.
- GONG, J. G. *et al.* 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, 2002.
- GOUGEON, A. Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates : Facts and Hypotheses. **Endocrine reviews**, v. 17, n. 2, p. 121–155, 1996.
- GRANGER, A. L. *et al.* Effects of breed and wintering diet on growth, puberty and plasma concentrations of growth hormone and insuline-like growth factor 1 in heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 6, n. 3, p. 253–262, 1989.
- GRIMARD, B. *et al.* Absence of response to oestrus induction and synchronization treatment is related to lipid mobilization in suckled beef cows. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 37, p. 129–140, 1997.
- GRIMARD, B. *et al.* Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 173–179, 1995.
- GROSS, A.; MCDONNELL, J. M.; KORSMEYER, S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes and Development**, v. 13, p. 1899–1911, 1999.
- GRUMMER, R.; CARROLL, D. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 3838–3852, 1991.

GRUMMER, R. R.; CARROLL, D. J. A Review of Lipoprotein Cholesterol Metabolism : Importance to Ovarian Function. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 3160–3173, 1988.

GU, L. *et al.* Metabolic control of oocyte development: linking maternal nutrition and reproductive outcomes. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 72, n. 2, p. 251–271, 2015.

GUEDON, L.; SAUMANDE, J.; DESBALS, B. Relationships between calf birth weight, prepartum concentrations of plasma energy metabolites and resumption of ovulation postpartum in limousine suckled beef cows. **Theriogenology**, v. 52, p. 779–789, 1999.

HANLON, D. W. *et al.* Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**, n. 47, p. 963–975, 1997.

HAUSMAN, G. J.; BARB, C. R.; LENTS, C. A. Leptin and reproductive function. **Biochimie**, v. 94, n. 10, p. 2075–2081, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.022>>.

HAWKINS, D. E. *et al.* Can beef heifers and young postpartum cows be physiologically and nutritionally manipulated to optimize reproductive efficiency? **Proceedings of the American Society of Animal Science**, v. 77, p. 1–10, 2000.

HESS, B. W. *et al.* Nutritional controls of beef cow reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. E90–E106, 2005. Disponível em: <[http://www1.foragebeef.ca/\\$foragebeef/frgebeef.nsf/e5ae854df3230ce787256a3300724e1d/75cfd0cca11208a98725717200635075/\\$FILE/reproeffnutrcontrols.pdf](http://www1.foragebeef.ca/$foragebeef/frgebeef.nsf/e5ae854df3230ce787256a3300724e1d/75cfd0cca11208a98725717200635075/$FILE/reproeffnutrcontrols.pdf)>.

HIGHTSHOE, R. B. *et al.* EFFECTS OF CALCIUM SOAPS OF FAITY ACIDS ON POSTPARTUM REPRODUCTIVE FUNCTION IN BEEF COWS. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 4097–4103, 1991.

HINEY, J. K.; OJEDA, S. R.; DEES, W. LES. Insuline-like growth factor I: a possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. **Neuroendocrinology**, v. 54, p. 420–423, 1991.

HUSSEIN, T. S.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Developmental Biology**, v. 296, n. 2, p. 514–521, 2006.

IRVING-RODGERS, H. F.; RODGERS, R. J. Extracellular matrix in ovarian follicular development and disease. **Cell Tissue Res**, v. 322, p. 89–98, 2005.

JINWEN DONG, DAVID F ALBERTINO, KATSUHIKO NISHIMORI, T RAJENDRA KUMAR, NAIFANG LU, M. M. M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, p. 531–535, 1996.

JOHN, G. B. *et al.* Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. **Developmental Biology**, v. 331, n. 2, p. 292–299, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.05.546>>.

KAHN, C. R. Insulin Resistance , Insulin Insensitivity , and Insulin Unresponsiveness : A Necessary Distinction. **Metabolism**, v. 27, n. 12, p. 1893–1902, 1978.

- KEISLER, D. H.; LUCY, M. C. Perception and Interpretation of the effects of undernutrition on reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 3, p. 1–17, 1996.
- KHIREDDINE, B. *et al.* INFLUENCE OF FLUSHING ON LH SECRETION, FOLLICULAR GROWTH AND THE RESPONSE TO ESTRUS SYNCHRONIZATION TREATMENT IN SUCKLED BEEF COWS. **Theriogenology**, v. 49, p. 1409–1423, 1998.
- KOSTER, J. D. DE; OPSOMER, G. Insulin Resistance in Dairy Cows. **Veterinary Clinics of NA: Food Animal Practice**, v. x, p. 1–24, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.04.002>>.
- KUBELKA, M. *et al.* Butyrolactone I Reversibly Inhibits Meiotic Maturation of Bovine Oocytes , Without Influencing Chromosome Condensation Activity. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 292–302, 2000.
- LALMAN, D. L. *et al.* Effect of dietary energy on milk production and metabolic hormones in thin, primiparous beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 530–538, 2000.
- LALMAN, D. L. *et al.* Influence of Postpartum Weight and Body Condition Change on Duration of Anestrus by Undernourished Suckled Beef Heifers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2003–2008, 1997.
- LAMB, C. Relationship Between Nutrition and Reproduction in Beef Cows. **North Florida Research and Education Center**, v. x, n. x, p. 4–14, 1999. Disponível em: <<http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2009/Lamb.pdf>>.
- LAMB, G. C. *et al.* Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. **Journal of animal science**, v. 88, n. 13 Suppl, p. E181–92, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783709>>. Acesso em: 6 abr. 2014.
- LAMMOGLIA, M. A. *et al.* Effects of Dietary Fat and Season on Steroid Hormonal Profiles Before Parturition and on Hormonal, Cholesterol, Triglycerides, Follicular Patterns, and Postpartum Reproduction in Brahman Cows. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2253–2262, 1996.
- LEE, W. *et al.* Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 on Folliculogenesis and Ovulation in the Rat. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 994–999, 2001.
- LI, H. J. *et al.* Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 89–98, 2009.
- LI, P. S.; WAGNER, W. C. In vivo and In vitro studies on the effect of adrenocorticotrophic hormone or cortisol on the pituitary to gonadotropin releasing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 25–37, 1983.
- LIMA, A. S. Metabolismo oxidativo, perfil bioquímico e função de polimorfonucleares de vacas holandesas primíparas e múltíparas no periparto suplementadas com vitaminas ADE. 2013. 1-119 p. **USP**, 2013.
- LIU, C. *et al.* Salvianolic Acid B Inhibits Hydrogen Peroxide-Induced Endothelial Cell Apoptosis through Regulating PI3K / Akt Signaling. **Plos One**, n. 12, p. 1–8, 2007.

- LOOR, J. J. *et al.* Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. **Physiol Genomics**, v. 27, n. June 2006, p. 29–41, 2006.
- LUCY, M. C. *et al.* Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF<sub>2</sub>alpha for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows , peripubertal beef heifers , and dairy heifers. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 982–995, 2001.
- MA, Y. *et al.* Two Distinct Stress Signaling Pathways Converge Upon the CHOP Promoter During the Mammalian Unfolded Protein Response. **J Mol. Biol.**, v. 318, p. 1351–1365, 2002.
- MADEJ, A. *et al.* Factors regulating ovarian function in pigs. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 347–361, 2005.
- MAGGIONI, D. *et al.* Efeito da nutrição sobre a reprodução de ruminantes: uma revisão. **Pubvet**, v. 2, n. 11, p. 1–16, 2008.
- MALHOTRA, J. D.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress : a vicious cycle or a double-edge sword? **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 9, n. 12, p. 1–25, 2007.
- MANCIO, A. *et al.* Fontes lipídicas dietéticas associadas ou não à gonadotrofina coriônica humana ( hCG ) na função reprodutiva e no metabolismo de lípidos de novilha. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 51, n. 2, p. 1999, 1999.
- MARCHESAN, D. *et al.* A Phospholipase D-dependent Process Forms Lipid Droplets Containing Caveolin , Adipocyte Differentiation-related Protein , and Vimentin in a Cell-free System. **The journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 29, p. 27293–27300, 2003.
- MARETT, L. C. *et al.* Response of plasma glucose , insulin , and nonesterified fatty acids to intravenous glucose tolerance tests in dairy cows during a 670-day lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 1, p. 179–189, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8205>>.
- MARTÍNEZ, M. F. *et al.* Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal reproduction science**, v. 86, n. 1–2, p. 37–52, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15721658>>. Acesso em: 19 out. 2014.
- MENEGHETTI, M. *et al.* Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 179–89, 15 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19344942>>. Acesso em: 3 abr. 2014.
- MORITA, Y. *et al.* Expression and possible function of glucose transporter protein GLUT1 during preimplantation mouse development from oocytes to blastocysts. **Biochem and Biophys Research Communic**, v. 188, n. 1, p. 8–15, 1992.
- MORRISON, D. G.; SPITZER, J. C.; PERKINS, J. L. Influence of Prepartum Body Condition Score Change on Reproduction in Multiparous Beef Cows Calving in Moderate

Body Condition. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1048–1054, 1999.

NILSSON, E.; PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 175, n. 1–2, p. 123–130, 2001.

NUGENT, R. A. *et al.* Relationship of post-partum interval in mature beef cows with nutritional environment, biological type and serum IGF-1 concentrations. **Animal Production**, v. 56, n. 2, p. 193–200, 1993.

OCCHIO, M. J. D.; BARUSELLI, P. S.; CAMPANILE, G. Influence of nutrition , body condition , and metabolic status on reproduction in female beef cattle : A review. **Theriogenology**, v. 125, p. 277–284, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.010>>.

OIKAWA, S.; OETZEL, G. R. Decreased Insulin Response in Dairy Cows Following a Four-Day Fast to Induce Hepatic Lipidosis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 8, p. 2999–3005, 2006. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72572-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72572-3)>.

OLIVEIRA, V. C. DE *et al.* Milk production and performance of calves from Nellore and crossbred cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 2074–2081, 2007.

OLTVAI, Z. N.; MILKMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 Heterodimerizes In Vivo with a Conserved Homolog , Bax , That Accelerates Programed Cell Death. **Cell**, v. 74, p. 609–619, 1993.

PACZKOWSKI, M. *et al.* Comparative Importance of Fatty Acid Beta-Oxidation to Nuclear Maturation , Gene Expression , and Glucose Metabolism in Mouse , Bovine , and Porcine Cumulus Oocyte Complexes. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 5, p. 1–11, 2013.

PANGAS, S. A.; JORGEZ, C. J.; MATZUK, M. M. Growth Differentiation Factor 9 Regulates Expression of the Bone Morphogenetic Protein Antagonist Gremlin. **The journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32281–32286, 2004.

PANTALEON, M.; KAYE, P. L. IGF-I and Insulin Regulate Glucose Transport in Mouse Blastocysts Via IGF-I Receptor. **Molecular Reproduction and Development**, v. 44, p. 71–76, 1996.

PERCIAVALLE, R. M. *et al.* Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 6, p. 575–583, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncb2488>>.

PERES, R. F. G. *et al.* Strategies to improve fertility in Bos indicus postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 72, n. 5, p. 681–9, 15 set. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559472>>. Acesso em: 3 abr. 2014.

PERRY, R. C. *et al.* INFLUENCE OF DIETARY ENERGY ON FOLLICULAR DEVELOPMENT, SERUM GONADOTROPINS, AND FIRST POSTPARTUM OVULATION IN SUCKLED BEEF COWS. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 3762–3773, 1991.

PFEIFER, L. *et al.* O nível de colesterol influencia a quantidade de folículos na punção folicular de vacas de corte. **Arch. Zootec.**, v. 58, n. 221, p. 153–156, 2009.

PINHEIRO, O. L. *et al.* ESTROUS BEHAVIOR AND THE ESTRUS-TO-OVULATION INTERVAL IN NELORE CATTLE ( *Bos indicus* ) WITH NATURAL ESTRUS OR ESTRUS INDUCED WITH. **Theriogenology**, v. 55, n. 14, p. 667–681, 1998.

PISANI, L. F. *et al.* Effects of pre-mating nutrition on mRNA levels of developmentally relevant genes in sheep oocytes and granulosa cells. **Reproduction**, v. 136, p. 303–312, 2008.

PURCELL, S. H.; CHI, M. M.; MOLEY, K. H. Insulin-Stimulated Glucose Uptake Occurs in Specialized Cells within the Cumulus Oocyte Complex. **Endocrinology**, v. 153, n. May, p. 2444–2454, 2012.

RANDEL, R. D. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. **Journal of animal science**, v. 68, p. 853–862, 1990.

REDDY, P. *et al.* Activation of Akt ( PKB ) and suppression of FKHRL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. **Developmental Biology**, v. 281, p. 160–170, 2005.

REDDY, P. *et al.* Oocyte-Specific Deletion of Pten Causes Premature Activation of the Primordial Follicle Pool. **Science**, v. 319, n. February, p. 611–614, 2008.

RENTSCH, J.; CHIESI, M. Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. **FEBS**, v. 379, p. 55–59, 1996.

RHODES, F. *et al.* 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.

RHODES, F.; ENTWISTLE, K. W.; KINDER, J. Changes in Ovarian Function and Gonadotropin Secretion Preceding the Onset of Nutritionally Induced Anestrus in *Bos indicus* Heifers. **Biology of reproduction**, v. 55, p. 1437–1443, 1996.

RHODES, F. M. *et al.* Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 139–150, 2002.

RICE, L. E. The Effects of Nutrition on Reproductive Performance of Beef Cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 7, n. 1, p. 1–26, 1991. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30807-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30807-0)>.

RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N. Changes in the metabolism of glucose , pyruvate , glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 257–262, 1994.

RIVERA, G. M. *et al.* Ovarian follicular wave synchronization and induction of ovulation in postpartum beef cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 1365–1375, 1998.

ROBERTS, A. J. *et al.* Circulating Insulin-Like Growth Factor I, Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins, Growth Hormone, and Resumption of Estrus in Postpartum Cows Subjected

to Dietary Energy Restriction. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 7, p. 1909–1917, 1997.

RUAS, J. *et al.* Concentrações Plasmáticas de Colesterol , Glicose e Uréia em Vacas Zebuínas , em Relação à Condição Corporal e ao Status Reprodutivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 2036–2042, 2000.

RUIZ-CORTEZ, Z.; OLIVERA-ANGEL, M. Ovarian follicular dynamics in suckled zebu (*Bos indicus*) cows monitored by real time ultrasonography. **Animal Reproduction Science**, v. 54, p. 211–220, 1999.

RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. Molecular mechanisms of ovulation : co-ordination through the cumulus complex. **Human Reproduction Update**, v. 13, n. 3, p. 289–312, 2007.

RUTTER, L. M.; RANDEL, R. D. POSTPARTUM NUTRIENT INTAKE AND BODY CONDITION: EFFECT ON PITUITARY FUNCTION AND ONSET OF ESTRUS IN BEEF CATTLE. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 2, p. 265–274, 1984.

RYAN, D. P. *et al.* Ovarian follicular recruitment, granulosa cell steroidogenic potential and growth hormone/insulin-like growth factor-I relationships in suckled beef cows consuming high lipid diets: effects of graded differences in body condition maintained during the pue. **Domestic animal endocrinology**, v. 11, n. 2, p. 161–74, abr. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8045098>>.

SÁ FILHO, M. F. *et al.* Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. **Animal reproduction science**, v. 129, n. 3–4, p. 132–9, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226935>>. Acesso em: 6 abr. 2014.

SÁ FILHO, M. F. *et al.* Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal reproduction science**, v. 120, n. 1–4, p. 23–30, jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20395079>>. Acesso em: 17 set. 2014.

SÁ FILHO, O. G. *et al.* Progesterone-based estrous synchronization protocols in non-suckled and suckled primiparous *Bos indicus* beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 119, n. 1–2, p. 9–16, maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20074876>>. Acesso em: 15 out. 2014.

SÁ FILHO, O. G.; THATCHER, W. W.; VASCONCELOS, J. L. M. Effect of progesterone and/or estradiol treatments prior to induction of ovulation on subsequent luteal lifespan in anestrus Nelore cows. **Animal reproduction science**, v. 112, n. 1–2, p. 95–106, maio 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18468816>>. Acesso em: 15 out. 2014.

SAIDUDDIN, S.; QUEVEDO, M. M.; FOOTE, W. D. Response of Beef Cows to Exogenous Progesterone and Estradiol at Various Stages Postpartum. **Journal of Animal Science**, v. 27, p. 1015–1020, 1968.

SAITO, T.; HIROI, M.; KATO, T. Development of Glucose Utilization Studied in Single Oocytes and Preimplantation Embryos from Mice. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 266–270, 1994.

- SALADIN, R. *et al.* Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. **Nature**, v. 377, p. 527–529, 1995.
- SALES, J. N. S. *et al.* Effects of eCG are more pronounced in primiparous than multiparous *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 86, n. 9, p. 2290–2295, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.023>>.
- SALES, J. N. S. *et al.* Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510–6, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503845>>.
- SALES, J. N. S. *et al.* Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 1–2, p. 12–8, mar. 2011a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376482>>. Acesso em: 3 abr. 2014.
- SALES, J. N. S. *et al.* Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 1–2, p. 12–8, mar. 2011b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376482>>. Acesso em: 25 fev. 2014.
- SARTORI, R. *et al.* Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403–9, nov. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673256>>.
- SCHILLO, K. K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **Journal of animal science**, v. 70, p. 1271–1282, 1992.
- SCHOENBERG, K. M.; EHRHARDT, R. M.; OVERTON, T. R. Effects of plane of nutrition and feed deprivation on insulin responses in dairy cattle during late gestation. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 2, p. 670–682, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4529>>.
- SCHOENFELDER, M.; EINSPANIER, R. Expression of Hyaluronan Synthases and Corresponding Hyaluronan Receptors Is Differentially Regulated During Oocyte Maturation in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. March, p. 269–277, 2003.
- SCHRICK, F. *et al.* Effect of dietary energy restriction on metabolic and endocrine responses during the estrous cycle of the suckled beef cow. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 3313–3321, 1990.
- SHARPE, P. H. *et al.* EFFECT OF MELATONIN ON POSTPARTUM ANESTRUS IN BEEF COWS. **Theriogenology**, v. 26, n. 5, p. 621–629, 1986.
- SHIVELY, T. E.; WILLIAMS, G. L. Patterns of tonic luteinizing hormone release and ovulation frequency in suckled anestrus beef cows following varying intervals of temporary weaning. **Domestic animal endocrinology**, v. 6, n. 4, p. 379–87, out. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2620508>>.
- SHORT, R E; BELLOWS, R A; STAIGMILLER, R B; BERARDINELLI, J G; CUSTER, E.

E. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 799–816, 1990.

SHORT, R. E.; ADAMS, D. C. Nutritional and Hormonal Interrelationships in Beef Cattle reproduction. **Journal of animal science**, v. 17, n. 68, p. 29–39, 1988. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.4141/cjas88-003>>.

SIMÕES, L. M. S. *et al.* Exposure to progesterone previous to the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 116, p. 28–33, 2018.

SMITH, T. R. *et al.* Metabolic Characteristics of Induced Ketosis in Normal and Obese Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1569–1581, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76087-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76087-9)>.

SOLDANI, R. *et al.* Modulation of anterior pituitary luteinizing hormone response to gonadotropin-releasing hormone by insulin-like growth factor I in vitro. **Fertility and Sterility**, v. 64, n. 3, p. 634–637, 1995. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)57804-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)57804-2)>.

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

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**, v. 71, n. 5, p. 1232–1241, 1993.

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 Animal Endocrinology**, v. 22, p. 237–254, 2002.

SPICER, L. J.; STEWART, R. E. Interaction Among Bovine Somatotropin, Insulin, and Gonadotropins on Steroid Production by Bovine Granulosa and Thecal Cells. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 5, p. 813–821, 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030296764299>>.

SPITZER, J. C. *et al.* Reproductive Responses and Calf Birth and Weaning Weights as Affected by Body Condition at Parturition and Postpartum Weight Gain in Primiparous Beef Cows. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1251–1257, 1995.

STAGG, K. *et al.* Effect of Calf Isolation on Follicular Wave Dynamics , Gonadotropin and Metabolic Hormone Changes , and Interval to First Ovulation in Beef Cows Fed Either of Two Energy Levels Postpartum. **Biology of reproduction**, v. 783, p. 777–783, 1998.

STEWART, R. E. *et al.* Levels of insuline-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibitin regular estrous cycles. **Endocrinology**, v. 137, n. 7, p. 2842–2850, 1996.

STRAUCH, T. A. *et al.* Influence of undegraded intake protein on reproductive performance

of primiparous beef heifers maintained on stockpiled fescue pasture. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 3, p. 574–581, 2001.

SUGIURA, K. *et al.* Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. **Development**, v. 135, n. 4, p. 786–786, 2008. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.020024>>.

SUZUKI, B. Y.; MIYOSHI, N.; ISEMURA, M. Health-promoting effects of green tea. **Proc Jpn Acad**, v. 88, p. 88–101, 2012.

TANGHE, S. *et al.* Minireview : Functions of the Cumulus Oophorus During Oocyte Maturation , Ovulation , and Fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. May, p. 414–424, 2002.

THATCHER, W. W. *et al.* Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. **Theriogenology**, v. 65, p. 30–44, 2006.

TRAN, H. *et al.* The Many Forks in FOXO ' s Road. **STKE**, v. 172, n. March, p. 1–11, 2003.

TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L. A.; DUFOUR, J. J. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle : a review. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3141–3151, 1995.

URNER, F.; SAKKAS, D. Characterization of Glycolysis and Pentose Phosphate Pathway Activity during Sperm Entry into the Mouse Oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 973–978, 1999.

VARANI, S. *et al.* Knockout of Pentraxin 3 , a Downstream Target of Female Subfertility. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 6, p. 1154–1167, 2002.

VASCONCELOS, J. L. M. *et al.* Intravaginal progesterone device and/or temporary weaning on reproductive performance of anestrous crossbred Angus x Nelore cows. **Animal reproduction science**, v. 111, n. 2–4, p. 302–11, abr. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18440167>>. Acesso em: 2 out. 2014.

VIGNERON, L. *et al.* Protein Synthesis and mRNA Storage in Cattle Oocytes Maintained Under Meiotic Block by Roscovitine Inhibition of MPF Activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, p. 457–465, 2004.

VIZCARRA, J. A. *et al.* Body Condition at Parturition and Postpartum Weight Gain Influence Luteal Activity and Concentrations of Glucose, Insulin, and Nonesterified Fatty Acids in Plasma of Primiparous Beef Cows. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 927–936, 1998a.

VIZCARRA, J. A. *et al.* Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose , insulin , and nonesterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows . **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 927–936, 1998b.

WAGNER, J. J. *et al.* CARCASS COMPOSITION IN MATURE HEREFORD COWS: ESTIMATION AND EFFECT ON DAILY METABOLIZABLE ENERGY REQUIREMENT DURING WINTER. **Journal of animal science**, v. 66, p. 603–612, 1988.

WANG, L. *et al.* Regulation of primordial follicle recruitment by cross-talk between the Notch and phosphatase and tensin homologue ( PTEN )/ AKT pathways. **Reproduction, Fertility and Development**, p. 1–13, 2014.

WANG, Q. *et al.* An intercellular pathway for glucose transport into mouse oocytes. **Am J Physiol Endocr Metab**, v. 302, p. 1511–1519, 2012.

WEBB, R. *et al.* Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. **Theriogenology**, v. 68, p. 22–29, 2007.

WEHRMAN, E.; WELSH, T. H.; WILLIAMS, G. L. Diet-Induced Environment , Hyperlipidemia in Cattle Modifies the Intrafollicular Cholesterol environment, Modulates Ovarian Follicular Dynamics , and Hastens the Onset of Postpartum luteal activity. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 514–522, 1991.

WETTEMANN, R. P. *et al.* Endocrine response of postpartum anestrous beef cows to GnRH or PMSG. **Theriogenology**, v. 18, n. 5, p. 599–613, 1982.

WETTEMANN, R. P.; BOSSIS, I. Energy Intake Regulates Ovarian Function in Beef Cattle. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, v. 3, p. 1–10, 2000.

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.

WILTBANK, M. C. *et al.* Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1568–82, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21958644>>. Acesso em: 19 out. 2014.

WILTBANK, M.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21–52, 2002.

WRENZYCKI, C. *et al.* Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 893–901, 2001.

WRIGHT, I. A. *et al.* Effects of body condition and estradiol on luteinizing hormone secretion in post-partum beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 9, n. 4, p. 305–312, 1992.

WU, L. L. *et al.* High-Fat Diet Causes Lipotoxicity Responses in Cumulus – Oocyte Complexes and Decreased Fertilization Rates. **Endocrinology**, v. 151, n. November, p. 5438–5445, 2010.

YAN, C. *et al.* Synergistic Roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in Ovarian Function. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 854–866, 2001. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/mend.15.6.0662>>.

YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 70, p. 159–169, 2002.

YANG, X. *et al.* Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus-oocyte complexes. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 6, p. 1438–1443, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.02.034>>.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, v. 54, p. 25–55, 2000.

YONEDA, T. *et al.* Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) dependent mechanism in response to the ER stress. **The Journal of Biological Chemistry**, n. Jan, p. 1–31, 2001.

ZHANG, K.; EALY, A. D. Disruption of fibroblast growth factor receptor signaling in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation reduces subsequent embryonic development. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 42, n. 4, p. 230–238, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2011.12.006>>.

ZHANG, K.; HANSEN, P. J.; EALY, A. D. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. **Reproduction**, v. 140, n. 6, p. 815–826, 2010.

ZHAO, F.; KEATING, A. F. Expression and Regulation of Glucose Transporters in the Bovine Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. July 2006, p. E76–E86, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2006-470>>.

ZHENG, P.; VASSENA, R.; LATHAM, K. E. Effects of in vitro oocyte maturation and embryo culture on the expression of glucose transporters, glucose metabolism and insulin signaling genes in rhesus monkey oocytes and preimplantation embryos. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, n. 6, p. 361–371, 2007.

ZONG, W. *et al.* BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. **Genes and Development**, v. 15, p. 1481–1486, 2001.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**ARTIGO** Perfil bioquímico e qualidade de oócito de primíparas *Bos indicus* submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação

## Resumo

Com o objetivo de verificar as causas da menor resposta de vacas primíparas *Bos indicus* ao protocolo de sincronização da ovulação, dois experimentos foram realizados para avaliar o perfil bioquímico (Experimentos 1 e 2), qualidade oocitária e das células foliculares (Experimento 1) e taxa de prenhez (Experimento 2). No Experimento 1, vacas primíparas (n=24) e múltíparas (n=24) foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação a base de estrógeno e progesterona. Cinco dias após a administração dos tratamentos hormonais (D5), realizou-se a contagem e aspiração (OPU) de todos os folículos maiores que 2 mm. Sete dias depois da OPU (D12) foi realizada a mensuração e aspiração do folículo dominante. Amostras de sangue foram colhidas no D5 e no D12 para avaliação das concentrações de glicose, colesterol, AGNE, IGF-1 e insulina. No Experimento 2, vacas primíparas (n=77) e múltíparas (n=84) foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação a base de estrógeno e progesterona e o diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF. Amostras de sangue foram colhidas no D10 para avaliação dos mesmos hormônios e metabólitos descritos no Experimento 1. No Experimento 1 não houve diferença entre as categorias no número de oócitos de grau 1 (P=0,83), grau 2 (P=0,23), grau 3 (P=0,51), no total de oócitos recuperados (P=0,14), no índice de qualidade oocitária (P=0,93) e no total de oócitos viáveis (P=0,38). O número de folículos no momento da aspiração folicular ( $20,7 \pm 1,5$  e  $18,0 \pm 1,9$ ; P=0,05) e o diâmetro do maior folículo no D12 ( $13,5 \pm 0,6$  e  $11,4 \pm 0,6$ ; P=0,04) foram maiores em vacas múltíparas e o número de oócitos degenerados foi maior em vacas primíparas ( $1,9 \pm 0,7$  e  $1,2 \pm 0,3$ ; P=0,05). No D5, não houve diferença entre as categorias nas concentrações de IGF-1 (P=0,47), insulina (P=0,08), colesterol total (P=0,47), AGNE (P=0,77) e glicose (P=0,55) no sangue e de IGF-1 (P=0,97) e insulina (P=0,11) no fluido folicular. No D12 não foi observada diferença entre as categorias nas concentrações de IGF-1 (P=0,26), colesterol total (P=0,32), AGNE (P=0,31) e glicose (P=0,93) no sangue. No entanto, a concentração sérica de insulina (P=0,04) foi maior na categoria primípara. Não houve correlação entre as concentrações de insulina no soro e no fluido folicular ( $r=0,17$ ; P=0,31). No entanto, verificou-se baixa correlação entre o soro e fluido folicular para as concentrações de IGF-1 ( $r=0,47$ ; P=0,002). Não foram observadas diferenças na quantificação de transcritos entre as categorias. No Experimento 2, não houve diferença nas concentrações de AGNE (P=0,12) e de insulina (P=0,16) no sangue e na taxa de prenhez entre as categorias [60% (30/50) primíparas; 60% (30/50) múltíparas]. No entanto, as concentrações de IGF-1 (P=0,0001), colesterol total (P=0,005) e glicose (P=0,01) no sangue foram maiores em vacas

primíparas. Conclui-se que a menor fertilidade de vacas primíparas *Bos indicus* no pós parto recente não está relacionada com a qualidade oocitária e de células foliculares e com alterações no perfil metabólico avaliado.

Palavras-chave: IATF, categoria animal, fertilidade, zebu.

## Abstract

In order to verify the causes of lower response of *Bos indicus* primiparous cows to the ovulation synchronization protocol, two experiments were performed to evaluate the biochemical profile (Experiments 1 and 2), oocyte and follicular cell quality (Experiment 1) and pregnancy rate (Experiment 2). In Experiment 1, primiparous (n=24) and multiparous (n=24) cows were submitted to an estrogen and progesterone ovulation synchronization protocol. Five days after the administration of hormonal treatments (D5), all follicles larger than 2 mm were counted and aspirated (OPU). Seven days after OPU (D12), measurement and aspiration of the dominant follicle were performed. Blood samples were collected on D5 and D12 for glucose, cholesterol, NEFA, IGF-1 and insulin concentrations. In Experiment 2, primiparous (n=77) and multiparous (n=84) cows were submitted to an estrogen and progesterone ovulation synchronization protocol and pregnancy diagnosis was performed 30 days after TAI. Blood samples were collected at D10 to evaluate the same hormones and metabolites described in Experiment 1. In Experiment 1 there was no difference between categories in the number of oocytes grade 1 (P=0.83), grade 2 (P=0.23), grade 3 (P=0.51), total oocytes recovered (P=0.14), oocyte quality index (P=0.93) and total viable oocytes (P=0.38). The number of follicles at the time of follicular aspiration ( $20.7 \pm 1.5$  and  $18.0 \pm 1.9$ ; P=0.05) and the diameter of the larger follicle on D12 ( $13.5 \pm 0.6$  and  $11.4 \pm 0.6$ ; P=0.04) were higher in multiparous cows and the number of degenerate oocytes was higher in primiparous cows ( $1.9 \pm 0.7$  and  $1.2 \pm 0.3$ ; P=0.05). On D5, there was no difference between categories in serum concentrations of IGF-1 (P=0.47), insulin (P=0.08), total cholesterol (P=0.47) and NEFA (P=0.77), plasma concentrations of glucose (P=0.55) and IGF-1 (P=0.97) and insulin (P=0.11) concentrations in the follicular fluid. On D12 there was no difference between categories in IGF-1 (P=0.26), total cholesterol (P=0.32), NEFA (P=0.31) and glucose (P=0.93) circulating concentrations. However, serum insulin concentration (P=0.04) was higher in primiparous cows. There was no correlation between serum and follicular fluid insulin concentrations ( $r=0.17$ ; P=0.31). However, there was a low correlation between serum and follicular fluid for IGF-1 concentrations ( $r=0.47$ ; P=0.002). No differences in the quantification of transcripts were observed between categories. In Experiment 2, there was no difference in serum concentrations of NEFA (P=0.12) and insulin (P=0.16) and pregnancy rate between categories [60% (30/50) primiparous; 60% (30/50) multiparous]. However, IGF-1 (P=0.0001), total cholesterol (P=0.005) and glucose (P=0.01) concentrations were higher in primiparous cows. It was concluded that lower fertility of *Bos indicus* primiparous cows in

recent postpartum is not related to follicular cells and oocyte quality, neither with changes in the metabolic profile evaluated.

Keywords: TAI, parity, fertility, zebu.

## Introdução

Atualmente, protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) estão bem estabelecidos e trazem grandes benefícios para a eficiência reprodutiva. Entretanto, a resposta ao protocolo de IATF e os resultados de prenhez em vacas primíparas é menor do que em vacas múltiparas [1,2]. Essa diferença se deve provavelmente a maior exigência nutricional em vacas primíparas, pois ocorre direcionamento da energia ingerida pelo animal para a lactação e crescimento corporal [3]. Assim, os efeitos de falhas no manejo nutricional que interferem na reprodução são mais acentuados em vacas primíparas [4–7].

Apesar desses conhecimentos, há uma carência de estudos que confirmam quais são as causas dessa diferença entre as categorias que possam justificar a menor eficiência reprodutiva em vacas primíparas *Bos indicus*. Além disso, tais efeitos ainda não foram verificados na qualidade do oócito e das células da granulosa [8]. Na tentativa de determinar as principais causas relacionadas a baixa fertilidade de primíparas *Bos indicus* submetidas a protocolo de IATF, foi levantada a hipótese que vacas primíparas *Bos indicus* possuem menor fertilidade por comprometimento na qualidade do oócito/células da granulosa e alterações no perfil metabólico no pós parto recente. Dessa forma, dois experimentos foram conduzidos para avaliar o perfil bioquímico e hormonal, qualidade oocitária e das células da granulosa (Exp. 1) e taxa de prenhez (Exp. 2) de vacas primíparas *Bos indicus* submetidas a protocolo de sincronização da ovulação a base de estrógeno e progesterona.

## Material e métodos

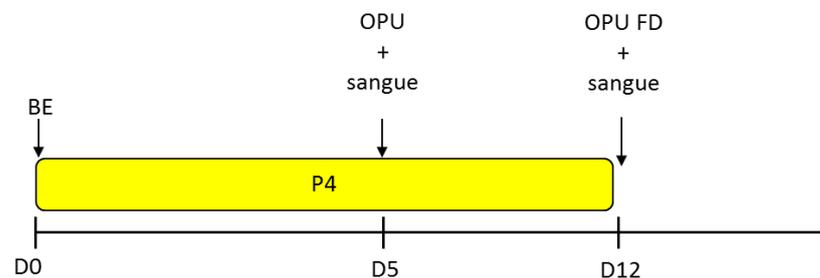
*Experimento 1: Perfil bioquímico e qualidade oocitária de vacas Bos indicus primíparas e múltiparas*

### *Animais e local de realização do estudo*

O experimento foi conduzido em fazenda comercial localizada no sudeste do estado de Minas Gerais, Brasil, em dezembro de 2016. No estudo foram utilizadas vacas primíparas (n=24) e multíparas (n=24) *Bos indicus* (Nelore), com pós parto entre 30 e 45 dias e escore de condição corporal (ECC) médio de  $2,6 \pm 0,03$  (escala de 1–5; [9]). Os animais foram mantidos em pastejo contínuo em *Brachiaria brizantha* e tiveram acesso *ad libitum* a água e suplementação mineral.

### *Desenho experimental*

As vacas primíparas e multíparas foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação a base de estrógeno e progesterona. Em dia aleatório do ciclo estral (D0), os animais receberam 2mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ourofino Agronegócio) e um dispositivo de progesterona (Sincrogest®, Ourofino, Brasil). Cinco dias após a administração dos tratamentos hormonais (D5) foi realizada a contagem e aspiração de todos os folículos maiores que 2 mm. Sete dias depois (D12) foi realizada a mensuração e aspiração do folículo dominante (Figura 1).



**Figura 1** - Sincronização da onda de crescimento folicular para realização da aspiração dos oócitos (D5) e do líquido folicular (D12). No D0 - administração de 2 mg de benzoato de estradiol e um implante intravaginal de progesterona. No D5 - aspiração folicular e coleta de sangue. No D12 - aspiração do folículo dominante, coleta de sangue e retirada do implante.

### *Aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia*

Os animais foram submetidos a duas sessões de aspiração folicular (OPU), realizadas no quinto (D5) e no décimo segundo dia (D12) do protocolo (Fig. 1). As aspirações foram realizadas com auxílio de ultrassonografia (US; Aloka, SSD500, Japão) com transdutor convexo (Aloka, transdutor convexo 7,5MHz, Japão) e linha de aspiração com 80 cm acoplada a agulha 20 G (WTA, Brasil). Antes das aspirações, foi realizada a contagem dos folículos antrais (D5) e mensuração do folículo de maior diâmetro (D12). O sistema de aspiração foi submetido a pressão negativa de 60-70 mmHg por bomba de vácuo (WTA). Todos os folículos visíveis (>3 mm) foram puncionados e o conteúdo foi coletado em tubo plástico de 50 mL (TPP, Trasadingen, Suíça) previamente preparado com 10 mL de solução tampão salina-fosfato (DMPBS®, Nutricell Nutrientes Celulares, Brasil) acrescida de 125 UI de heparina sódica/mL (Liquemine, Roche, Brasil) e mantida sob temperaturas entre 35 e 36°C. O tubo plástico contendo o líquido aspirado foi despejado em filtro para coleta de oócitos com malha de 80-µm (WTA). Em seguida, o filtrado foi transferido para placas de petri específicas para cultivo celular de 100 x 20 mm, livres de DNase e RNase (Corning, EUA) contendo DMPBS acrescido de 1g de álcool polivinílico (PVA) para busca, avaliação e seleção dos complexos cumulus-oócitos (CCOs), sob estereomicroscópio (Nikon, SMZ645, Japão).

### *Análise morfológica e manipulação dos oócitos e células do cumulus*

Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) contidos no fluido folicular, obtido conforme descrito no item anterior, foram submetido a classificação e avaliação sob estereomicroscópio (Nikon®, SMZ645, Japão) e composição do índice de qualidade oocitária  $[IQO = (\text{grau I} * 1 + \text{grau II} * 2 + \text{grau III} * 3 + \text{não viáveis} * 4) / \text{total de oócitos}]$ , sendo que quanto menor o IQO, maior a qualidade oocitária [10]. Em seguida, os oócitos foram desnudados por agitação em vórtex e por pipetagem. O conjunto de oócitos desnudos de cada animal foi armazenado separadamente em eppendorfs livres de DNase e RNase (Tubos Eppendorf 3810X standard, Eppendorf, Alemanha) contendo solução de PBS+RNA later

(RNAlater™ Stabilization Solution, Invitrogen, Califórnia, EUA) na proporção de 1:2. A solução residual contendo apenas células do cumulus foi centrifugada para retirada do sobrenadante e o pellet ressuspendido em solução PBS para a segunda centrifugação. O sobrenadante foi novamente desprezado e o volume do pellet final foi estimado para adição de quantidade equivalente de PBS. Por fim, RNAlater foi adicionado na proporção de 1:2µl (PBS+céls granulosa:RNAlater). O material preparado foi transportado ao laboratório em caixas de isopor com gelo e em seguida, armazenado em ultrafreezer na temperatura de -80°C.

*Perfil metabólico de vacas Bos indicus primíparas e multíparas*

As colheitas de sangue foram realizadas de forma concomitante às aspirações foliculares (D5) e do FD (D12) para avaliação metabólica e hormonal. As amostras foram colhidas em 3 tubos a vácuo de 10 ml (Vacutainer, Becton-Dickinson e Company, EUA), sendo um com fluoreto de sódio e dois sem anticoagulante. Durante as colheitas, o sangue colhido foi mantido em caixa de isopor com gelo e, então, conduzido ao laboratório. O plasma e soro foram separados por centrifugação (3000 rpm, Centrífuga Excelsa Baby, Fanem, Brasil) durante 10 minutos. O soro e plasma separados foram acondicionados em tubos estéreis (Tubos Eppendorf 3810X standard, Eppendorf, Alemanha) com identificação e em seguida, armazenados em freezer a -21°C até posterior análise.

As amostras de líquido folicular foram obtidas por aspiração do folículo dominante, 12 dias após o início da sincronização. Imediatamente antes da aspiração do FD foi realizada a mensuração do maior diâmetro desse folículo por ultrassonografia transvaginal com probe microconvexa de frequência 7,5 MHz. O conteúdo do FD foi direcionado para um tudo de 5 mL e ao final da aspiração, o líquido folicular foi aferido, centrifugado e armazenado em tubo plástico (Tubos Eppendorf 3810X standard, Eppendorf, Alemanha) com identificação e em seguida, armazenados em freezer a -21°C até posterior análise.

As avaliações hormonais foram realizadas no sangue e no líquido folicular. As avaliações metabólicas foram realizadas somente no sangue. Na avaliação metabólica, foram analisadas as concentrações de glicose, ácidos graxos não esterificados (AGNE) e colesterol e na hormonal, as concentrações de insulina e IGF-1. A análise do perfil metabólico foi

realizada no laboratório de análises clínicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e as concentrações de insulina e IGF-1 no Laboratório de Apoio, Produção e Saúde Animal – UNESP – Araçatuba/SP.

As concentrações plasmáticas de glicose e séricas de colesterol e AGNE foram realizadas por analisador bioquímico automático (Randox, modelo RX Daytona, FURUNO Electric Co. LTD, Nishinomiya, Japão) utilizando kits comerciais (Randox Laboratories LTD, Contry Antrim, United Kingdom) específicos (Glicose: código GL3815, AGNE: código FA115, Colesterol: código CH3810) e os resultados expressos em mg/dL (glicose e colesterol) e mmol/L (AGNE).

A concentração de IGF-1 total foi quantificada no soro sanguíneo e no fluido folicular por ELISA em duplicata, utilizando o sistema de amplificação biotina-estreptavidina peroxidase em ensaio competitivo, como descrito por Maioli [11]. Os coeficientes de variação alto e baixo intra-ensaio foram 6,9% e 10,2%; respectivamente. Já o coeficiente de variação alto e baixo inter-ensaio foram 15,4% e 14,5%; respectivamente. Os limites de detecção e quantificação médios foram de 5,347 ng/mL e 16,202ng/mL.

As concentrações de insulina no soro sanguíneo e no fluido folicular foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA). As placas foram sensibilizadas com IgG de cabra anti-Guinea pig (Antibodies Incorporated). Em seguida foi realizado o bloqueio dos sítios de ligação remanescentes nos poços, com adição de PBS-BSA 1%, pH=7,2. A quantificação da insulina foi feita utilizando-se o sistema de amplificação biotina-estreptavidina peroxidase em um ensaio competitivo (Streptavidin-POD conjugate 500 U/mL, Roche). A determinação da densidade óptica foi realizada em leitora de microplacas (Sunrise, Tecan, cod. 16039400) utilizando o comprimento de onda de 450 nm.

#### *Extração de RNA total e transcrição reversa do RNAm*

Os oócitos e células do cumulus armazenados em ultrafreezer à -80°C foram transportados em nitrogênio líquido para o Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da FZEA – USP, onde a quantificação dos transcritos foi realizada. O RNA total proveniente das células do cumulus obtidas conforme descrito no experimento 1 foi

isolado com a utilização de reagente TRIzol (Invitrogen, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Solução de Glycoblue (Invitrogen, Califórnia, EUA) foi adicionada ao processo para melhor evidênciação do pellet contendo o RNA. O sedimento final obtido, de coloração azul, foi dissolvido em água livre de RNase (Nuclease-freewater, Invitrogen, Califórnia, EUA) para mensuração da concentração final de RNA pelo Nanodrop 2000 (ThermoScientific) e a qualidade da leitura foi avaliada pela razão 260/280.

A reação de transcrição reversa foi realizada pelo kit comercial High Capacity (Applied Biosystems, Massachusetts, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de RT-qPCR (Quant Studio 6 Flex, Applied Biosystems) foram realizadas utilizando aproximadamente 11ng de cDNA para cada gene e 75nM de cada primer utilizando o Power SYBER Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems, Massachusetts, EUA). Os *primers forward* e *reverse* específicos foram testados previamente através de curvas de eficiência e os *amplicons* obtidos foram sequenciados para avaliar sua especificidade, a identificação e sequência dos *primers* utilizados seguem na tabela 1.

Tabela 1. Gene alvo, sequência dos primers (*forward* e *reverse*), tamanho do amplicon (pares de base – pb) e número de acesso dos primers usados para RT-qPCR nas células do cumulus.

<b>Gene</b>	<b>Sequência dos primers (5'–3')</b>	<b>pb</b>	<b>N. acesso.</b>
<i>BAX</i>	FP: CCCGAGTTGATCAGGACCAT RP: CACTCCAGCCACAAAGATGG	153	NM_173894.1
<i>BCL-2</i>	FP: CTTTGTGGAGCTGTATGGC RP: CCAGATAGGCACCCAGGG	119	NM_001166486.1
<i>FOXO3a</i>	FP: CGAAGTGGAGCTAGACCCGG RP: CGGGGATCATGGAGTCAGCA	134	NM_001206083.1
<i>PI3K</i>	FP: ACACAGCTGACGGGACCTTT RP: CCATATTTCCCATCTCGGTGA	127	NM_174575.1
<i>PTEN</i>	FP: GCCACAAAGTGCCTCGTTTACC RP: AGAAGGCAACTCTGCCAAACAC	120	XM_613125.6
<i>AKT</i>	FP: TAAAGAAGGAGGTCATCGTGG RP: CGGGACAGGTGGAAGAAAA	181	NM_173986.2
<i>MAPK</i>	FP: CATTATTCGAGCACCGACCA RP: TTGCTGAGGTGTTGCGTCTT	105	NM_001034769.

---

<i>IRE1</i>	FP: ATGAGGAGACCGGCATGGTG RP: AAACATGCCCCGGTACACGA	101	XM_010824247.1
<i>ATF6</i>	FP: AGAGGAGCAAGACACATCGG RP: CAGTTAGCACCATCAGGGCT	95	XM_003585816.2
<i>SOD1</i>	FP: AAGATGAAGAGAGGCATGTTGGA RP: GATGGCAACACCGTTTTTGTC	65	NM_174615.2
<i>SOD2</i>	FP: TCTGTTGGTGTCCAAGGCTC RP: AGCAGGGGGATAAGACCTGT	125	NM_201527.2
<i>CHOP10</i>	FP: CAAAGCCGGAACCTGAGGAGA RP: TCAGGCTCTGCTTTCAGGTGTG	79	NM_001078163.1
<i>HAS2</i>	FP: CCTAAACATTTGAGACTCCCCC RP: CACAATGCATCTTGTTTCAGCTC	193	NM_174079.2
<i>PLIN2</i>	FP: TGCACTCACCAAATCAGAGC RP: GCAGCTTGGTGGACAGAGAT	206	NM_173980.2
<i>FABP3</i>	FP: AAGTCAAGTCCATCGTGACGC RP: AACTGCAGTGCCATGGGTGA	134	NM_174313.2
<i>SREBP1</i>	FP: TGCTGACCGACATAGAAGACAT RP: CGTAGGGCGGGTCGAATAG	81	NM_001113302.1
<i>NRF2</i>	FP: CCACCAGTACCGCCGTGTC RP: ATGTCAATCAAATCCATGTCCTGCT	153	NM_001011678.2
<i>RPL15</i>	FP: CAAACGCCAGTTCCTAAGG RP: TCGAGCAAACCTTGAGCTGGTT	76	NM_001077866.1
<i>PPIA</i>	FP: CATAAGGTCCTGGCATC RP: CACGTGCTTGCCATCCAA	108	NM_178320.2
<i>YWHAZ</i>	FP: GCATCCCACAGACTATTTCC RP: GCAAAGACAATGACAGACCA	120	NM_174814.2

---

A quantificação relativa da expressão gênica foi feita com uma etapa de desnaturação a 95°C por 10 min, seguido por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos. Foi realizada análise de dissociação para garantir a especificidade do produto gerado. Os valores brutos de Ct (ciclos para *threshold*) foram normalizados pela média geométrica dos genes de referência (*RPL15*, *PPIA* e *YWHAZ*), assim como já descrito em estudos similares [12]. Os resultados normalizados foram utilizados para calcular a

expressão relativa por transformação  $2^{-\Delta C_t}$ . Controles negativos, compostos pela combinação de reagentes da reação de PCR foram executados junto com cada grupo de amostras. A relação dos genes alvo e suas respectivas funções estão ilustradas na tabela 2.

Tabela 2. Símbolo e função dos genes avaliados nas células do cumulus no pós parto de primíparas e múltíparas *Bos indicus*.

<b>Símbolo do Gene</b>	<b>Função</b>
<i>BAX</i>	Controle da apoptose
<i>BCL2</i>	Controle da apoptose
<i>PI3K</i>	Controle da via PI3K/ativação celular
<i>PTEN</i>	Controle da via PI3K
<i>AKT</i>	Controle da via PI3K
<i>FOXO3</i>	Controle da via PI3K/proliferação celular
<i>MAPK</i>	Progressão da meiose
<i>IRE1</i>	Estresse do RE e apoptose
<i>ATF6</i>	Estresse do RE e apoptose
<i>CHOP10</i>	Estresse do RE e apoptose
<i>NRF2</i>	Resposta ao estresse oxidativo e do RE
<i>SOD1</i>	Resposta ao estresse oxidativo e do RE
<i>SOD2</i>	Resposta ao estresse oxidativo e do RE
<i>HAS2</i>	Expansão do cumulus
<i>PLIN2</i>	Metabolismo lipídico
<i>FABP3</i>	Metabolismo lipídico
<i>SREBP1</i>	Metabolismo lipídico
<i>RPL15</i>	Gene de referência
<i>PPIA</i>	Gene de referência
<i>YWHAZ</i>	Gene de referência

***Experimento 2: Taxa de prenhez, perfil metabólico e perfil hormonal de vacas Bos indicus primíparas e múltíparas submetidas a protocolo de IATF a base de estrógeno e progesterona***

### *Animais e local de realização do estudo*

O experimento foi conduzido em fazenda comercial localizada no centroeste do Brasil, em fevereiro de 2018. As fêmeas utilizadas (n=161) pertenciam a raça Nelore (*Bos indicus*), de categoria primípara (n=77) e múltipara (n=84), com período pós-parto entre 30 e 50 dias, escore de condição corporal (ECC) médio de  $2,89 \pm 0,02$  (escala de 1 – 5; [9]). Os animais foram mantidos em pastejo contínuo em *Brachiaria brizantha* e tiveram acesso *ad libitum* a água e suplementação mineral.

### *Desenho experimental*

As vacas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest®, Ouro Fino, Brasil) e administrou-se 2mg de benzoato de estradiol i.m. (Estrogin®, Farmavet, Brasil). No D8, o dispositivo de progesterona foi retirado e administrou-se i.m. 500 µg de cloprostenol (Sincrocio®, Ouro Fino, Brasil), 1mg de cipionato de estradiol (ECP®, Pfizer, Brasil) e 300 UI de eCG (Folligon®, Intervet, Holanda). Dois dias depois (D10), as vacas foram submetidas a inseminação artificial com sêmen comercial congelado de um único touro com fertilidade comprovada. O procedimento de IA foi realizado por um único técnico. Nesse mesmo dia, amostras de sangue foram colhidas de um subgrupo de animais (n=100; primíparas n=50; múltiparas n=50) para análise metabólica e hormonal, conforme descrito no experimento 1. Todos os animais foram submetidos a exame ultrassonográfico 30 dias após a inseminação artificial para verificação da taxa de prenhez (US; Mindray DP2200 VET, transdutor linear 5 MHz, China).

### *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows®. Os dados contínuos foram testados quanto à normalidade dos resíduos e analisados pelo procedimento UNIVARIATE (transformados quando necessário) e submetidos ao teste de Bartlett para avaliar a homogeneidade das variâncias. O procedimento GLIMMIX foi utilizado para determinar diferenças significativas entre os grupos. Os valores dos dados contínuos foram expressos como média  $\pm$  EPM. As variáveis inicialmente incluídas no modelo para a análise de P/IA foram categoria animal (Primípara e Multípara), ECC no primeiro dia do protocolo de sincronização e interações. Os dados foram analisados por regressão logística multivariada usando o procedimento LOGISTIC. As variáveis foram removidas por eliminação retrógrada, com base no critério estatístico de Wald quando  $P > 0,20$ . As variáveis incluídas no modelo final para análise de P/IA foram categoria, ECC e interações. A P/AI foi analisada utilizando o procedimento GLIMMIX com distribuição binomial e expressa como porcentagem (%). Correlações entre as variáveis analisadas foram realizadas pelo procedimento CORR do SAS. Os dados de expressão gênica foram normalizados em função da média dos genes de referência e comparados pelo teste-T de Student. Diferenças foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$ .

## Resultados

### *Experimento 1: Qualidade oocitária e perfil bioquímico de vacas Bos indicus primíparas e multíparas*

Não houve interação entre categoria e ECC ( $P > 0,05$ ) para as variáveis de dinâmica folicular, qualidade oocitária e análise metabólica e hormonal. Não houve diferença entre o ECC de primíparas ( $2,91 \pm 0,03$ ) e multíparas ( $2,88 \pm 0,03$ ;  $P > 0,05$ ). O total de oócitos recuperados ( $P = 0,14$ ), número de oócitos de grau 1 ( $P = 0,83$ ), grau 2 ( $P = 0,23$ ), grau 3 ( $P = 0,51$ ), índice de qualidade oocitária ( $P = 0,93$ ) e total de oócitos viáveis ( $P = 0,38$ ) não diferiram entre vacas primíparas e multíparas. No entanto, número de folículos no momento da aspiração folicular ( $20,7 \pm 1,5$  e  $18,0 \pm 1,9$ ;  $P = 0,05$ ) e diâmetro do maior folículo no D12

(13,5±0,6 e 11,4±0,6; P=0,04) foram maiores em vacas multíparas. Além disso, o número de oócitos degenerados foi maior em vacas primíparas (1,9±0,7 e 1,2±0,3; P=0,05; tabela 3).

Tabela 3. Avaliação quantitativa e qualitativa (média±erro) de oócitos obtidos por aspiração folicular (OPU) em vacas *Bos indicus* primíparas (n=24) e multíparas (n=24) submetidas a protocolo de sincronização da ovulação no pós parto recente

	Primíparas	Multíparas	P
Nº de folículos	18,0±1,9	20,7±1,5	0,05
Ø do maior folículo D12	11,4±0,6	13,5±0,6	0,04
Nº de oócitos			
Degenerados	1,9±0,7	1,2±0,3	0,05
Grau 1	4,7±0,8	5,0±0,8	0,83
Grau 2	4,1±1,0	3,5±0,4	0,23
Grau 3	3,5±0,8	3,1±0,6	0,51
Total de oócitos viáveis	12,3±1,9	11,5±1,3	0,38
Índice de qualidade oocitária			
Total de oócitos recuperados	14,2±1,9	12,8±1,2	0,14

Índice de Qualidade Oocitária = (grau I\*1+grau II\*2+grau III\*3+nãoviáveis\*4)/total de oócitos; Ø: diâmetro em milímetros.

Em relação ao perfil bioquímico no momento da OPU (D5), não houve diferença entre as categorias nas concentrações de IGF-1 (P=0,47), insulina (P=0,08), colesterol total (P=0,47) e AGNE (P=0,77) no soro sanguíneo, de glicose (P=0,55) no plasma sanguíneo e IGF-1 (P=0,97) e insulina (P=0,11) no fluido folicular. No momento da aspiração do folículo dominante (D12), não foi observada diferença entre as categorias nas concentrações de IGF-1 (P=0,26), colesterol total (P=0,32) e AGNE (P=0,31) no soro sanguíneo e de glicose (P=0,93) no plasma sanguíneo. No entanto, a concentração sérica de insulina foi maior em vacas primíparas (P=0,04; tabela 4). Não houve correlação entre as concentrações de insulina no soro e no fluido folicular (r=0,17; P=0,31). No entanto, verificou-se correlação entre as concentrações de IGF-1 no soro e fluido folicular (r=0,47; P=0,002).

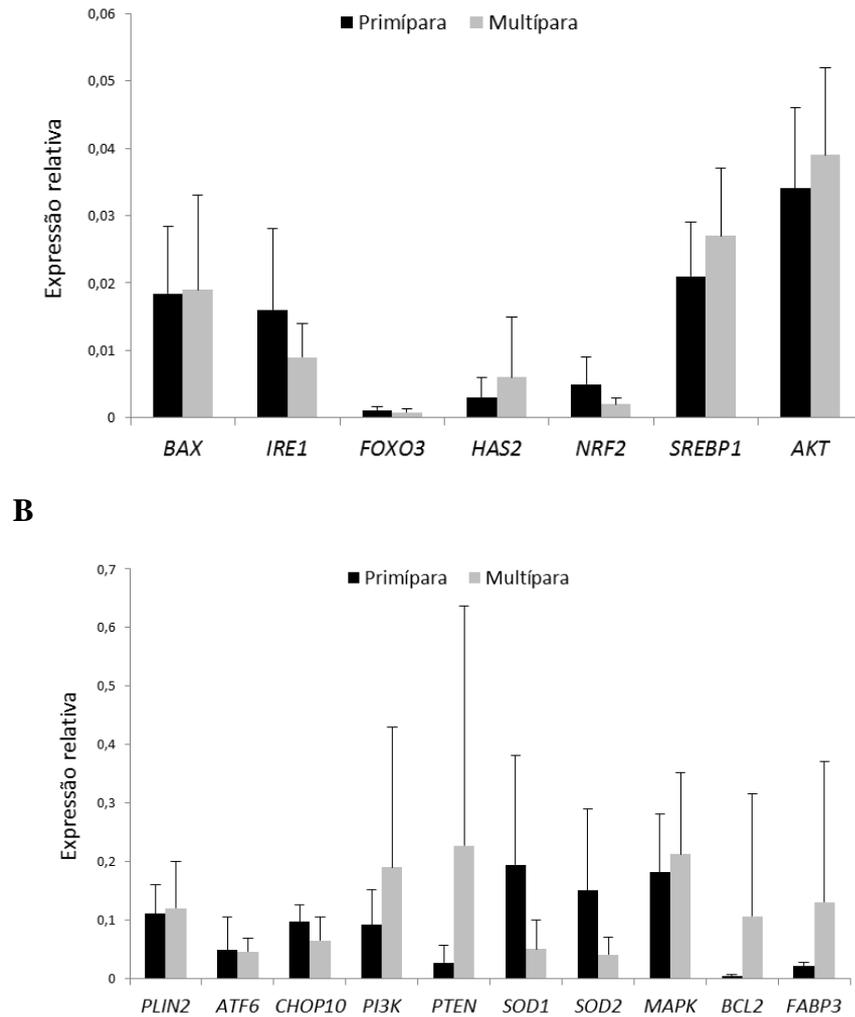
Tabela 4. Perfil metabólico e hormonal de vacas *Bos indicus* primíparas e múltíparas submetidas a aspiração folicular no dia 5 (folículos >3mm) e no dia 12 (folículo dominante) do protocolo.

	<b>Primípara</b>	<b>Múltípara</b>	<b>P</b>
<b>OPU (D5)</b>			
IGF-1 (ng/mL)	166,81±13,0	156,82±13,1	0,47
Insulina (μUI/mL)	16,88±3,8	10,33±1,9	0,08
Colesterol (mg/dL)	143,63±4,7	150,21±5,2	0,47
Glicose (mg/dL)	102,27±4,9	98,33±5,3	0,55
AGNE (mmol/L)	0,62±0,07	0,67±0,08	0,77
<b>Aspiração FD (D12)</b>			
IGF-1 (ng/mL)	171,63±10,3	192,65±12,5	0,26
IGF-1 FF (ng/mL)	149,76±26,5	136,0±10,0	0,97
Insulina (μUI/mL)	21,07±2,9	14,91±1,9	0,04
Insulina FF (μUI/mL)	11,02±1,4	22,57±7,7	0,11
Colesterol (mg/dL)	141,45±4,8	149,91±5,8	0,32
Glicose (mg/dL)	90,89±3,3	91,15±4,3	0,93
AGNE (mmol/L)	0,68±0,06	0,59±0,06	0,31

OPU – aspiração folicular; D5 – dia 5 do protocolo; D12 – dia 12 do protocolo; IGF-1 – fator semelhante a insulina 1; FF – fluido folicular; AGNE – ácidos graxos não esterificados; P – significância.

Na avaliação de transcritos em oócitos não foram obtidos resultados, pois quantificação de RNA nos oócitos foi baixa e não gerou amplificação gênica até o 35º ciclo de replicação na análise de qPCR. Não foram observadas diferenças na quantificação de transcritos em células da granulosa entre as categorias (figuras A e B).

**A**



**Figuras A e B.** Expressão relativa dos transcritos (média±erro) associados ao controle da apoptose (*BAX* e *BCL2*), ativação celular pela via PI3K (*PI3K*, *PTEN*, *AKT* e *FOXO3*), progressão da meiose (*MAPK*), estresse do retículo endoplasmático e apoptose (*IRE1*, *ATF6* e *CHOP10*), resposta ao estresse oxidativo (*NRF2*, *SOD1* e *SOD2*), expansão do cumulus (*HAS2*) e metabolismo lipídico (*PLIN2*, *FABP3* e *SREBP1*), obtidos por qPCR em tempo real de células do cumulus de vacas *Bos indicus* primíparas e múltiparas. Para todos os ensaios, foram utilizados três genes de referência (*PPIA*, *RPL15* e *YWHAZ*).

**Experimento 2: Taxa de prenhez, perfil metabólico e perfil hormonal de vacas *Bos indicus* primíparas e múltiparas submetidas a protocolo de IATF a base de estrógeno e progesterona**

Não houve interação entre categoria e ECC ( $P > 0,05$ ) para as variáveis de dinâmica folicular, análise metabólica, hormonal e taxa de prenhez. Não foi observada diferença entre

as categorias nas concentrações séricas de AGNE ( $P=0,12$ ) e insulina ( $P=0,16$ ). No entanto, as concentrações séricas de IGF-1 ( $P=0,0001$ ) e colesterol total ( $P=0,005$ ) e plasmáticas de glicose ( $P=0,01$ ) foram maiores em vacas primíparas (tabela 5). Não houve diferença na taxa de prenhez entre as categorias [primíparas 60% (30/50) e múltíparas 60% (30/50)].

Tabela 5. Perfil metabólico e hormonal de vacas *Bos indicus* primíparas e múltíparas submetidas a protocolo de IATF a base de estrógeno e progesterona.

	<b>Primípara</b>	<b>Múltípara</b>	<b>P</b>
IGF-1 (ng/mL)	278,2±8,0	172,3±9,6	0,0001
Colesterol (mg/dL)	224,3±4,7	203,0±4,9	0,005
Glicose (mg/dL)	114,8±4,3	98,8±3,1	0,01
AGNE (mmol/L)	0,6±0,03	0,5±0,03	0,12
Insulina (μUI/mL)	17,7±3,5	19,9±3,4	0,16

IGF-1 – fator semelhante a insulina 1; FF – fluido folicular; AGNE – ácidos graxos não esterificados; P – significância.

## Discussão

Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo de caracterização do perfil bioquímico e da qualidade oocitária de vacas primíparas *Bos indicus* em pós parto recente. Nesse trabalho, verificamos que as variáveis de qualidade oocitária e de quantificação de transcritos avaliados foram similares entre primíparas e múltíparas. No entanto, o número de oócitos degenerados foi maior em vacas primíparas. Além disso, as concentrações de metabolitos que poderiam interferir na qualidade de oócitos de vacas submetidas a punção folicular foram similares entre as categorias estudadas. Entretanto, no estudo de fertilidade, as concentrações de glicose, IGF-1 e colesterol total foram maiores em vacas primíparas, o que provavelmente promoveu resultados de concepção acima da média (60%) e similares à vacas múltíparas após serem submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação. Assim, a hipótese de que vacas primíparas *Bos indicus* possuem menor fertilidade por

comprometimento na qualidade do oócito/células da granulosa e por modificação no perfil metabólico no pós parto recente foi parcialmente rejeitada.

No presente estudo, não foi verificada diferença na qualidade oocitária entre vacas primíparas e multíparas no pós parto recente. Os possíveis efeitos negativos no oócito decorrentes da baixa concentração de glicose e alta concentração de AGNE observadas em vacas produtoras de leite [13] e de baixas concentrações de colesterol [14], insulina e IGF-1 [15] não foram verificados nos animais desse experimento no momento da OPU, devido as concentração desses hormônios e metabólitos terem sido semelhantes entre as categorias. De forma similar, a expressão de transcritos relacionados ao controle da apoptose (*BAX* e *BCL2*), ativação celular pela via PI3K (*PI3K*, *PTEN*, *AKT* e *FOXO3*), progressão da meiose (*MAPK*), estresse do retículo endoplasmático e apoptose (*IRE1*, *ATF6* e *CHOP10*), resposta ao estresse oxidativo (*NRF2*, *SOD1* e *SOD2*), expansão do cumulus (*HAS2*) e metabolismo lipídico (*PLIN2*, *FABP3* e *SREBP1*) foram similares entre primíparas e multíparas, não sendo esse o fator determinante da menor taxa de prenhez em vacas de primeiro parto. O maior número de oócitos degenerados encontrado em primíparas pode estar relacionado à menor pulsatilidade de LH [16]. Em oócitos degenerados, observa-se menor expressão nas células da granulosa de receptores para LH e do gene Versican (proteína da matriz extracelular que se liga ao ácido hialurônico estimulado pela elevação na concentração de LH) que são importantes para o desenvolvimento final do oócito [17]. A expressão de receptores para LH em bovinos inicia-se no quinto dia da onda folicular [15], indicando a intensa participação desse hormônio na atividade das células da granulosa, no desenvolvimento oocitário e na fertilidade [18].

De forma inesperada nesse estudo, não foram observadas diferenças nas taxas de prenhez entre vacas primíparas e multíparas, visto que dados da literatura demonstraram redução na taxa de prenhez de vacas primíparas *Bos indicus* submetidas a protocolos de sincronização da ovulação no pós parto recente [7,8,19]. Provavelmente, os animais do estudo de ambas as categorias estavam em condição metabólica favorável (maiores concentrações de IGF-1, glicose e colesterol em primíparas), o que permitiu melhor resposta ao protocolo de IATF e fertilidade semelhante a multíparas. Alguns estudos têm demonstrado que o aumento nas concentrações de glicose [20,21], colesterol [22] e IGF-1 [23,24] melhoram a fertilidade em vacas.

A maior concentração de IGF-1 observada em vacas primípara também pode estar relacionada com o fato desses animais ainda apresentarem crescimento corporal [4,25].

Estudos em camundongos demonstraram maiores concentrações séricas de IGF-I durante a fase de crescimento [24,26]. Dessa forma, a demanda energética de manutenção associada ao crescimento corporal em primíparas aumenta a necessidade desse hormônio para o adequado funcionamento do eixo reprodutivo.

Outro fator que pode explicar a menor fertilidade em vacas primíparas é a produção e liberação de LH. No presente estudo, não foram mensuradas as concentrações circulantes de LH, porém, o diâmetro do maior folículo no D12 foi maior em vacas múltiparas, sugerindo maior pulsatilidade de LH nos animais dessa categoria [6,27]. O maior diâmetro do folículo pré ovulatório eleva a taxa de ovulação em resposta aos protocolos de sincronização, o que influencia positivamente na taxa de prenhez [5–7,28–30]. Em vacas de corte, a presença do bezerro e o balanço energético negativo são dois fatores que atrasam a retomada da ciclicidade no pós-parto, devido ao efeito negativo na frequência de pulsos de LH e no desenvolvimento folicular [31]. Tal ação resulta em falhas na ovulação e prolongado anestro pós-parto [32,33]. Esses efeitos são mais pronunciados em vacas primíparas, devido o gasto energético e proteico adicional para o crescimento [25]. A insuficiência de glicose e o excesso de formação de AGNE pelo balanço energético negativo sobrecarregam o fígado, promovendo a formação de corpos cetônicos, dentre os quais se destaca o beta-hidroxibutirato [34]. Nessa condição, ocorre a redução nas concentrações e na pulsatilidade de LH devido ao estímulo inibitório desses metabólitos sobre o hipotálamo [35]. Ainda, vacas em balanço energético negativo possuem concentrações baixa de leptina [36] e alta de neuropeptídeo Y [37], que estão correlacionados negativamente com produção e liberação de LH [20,27].

Em conclusão, a qualidade oocitária e expressão dos genes avaliados nas células granulosa não relacionam-se com a menor fertilidade em vacas primíparas. Além disso, não podemos inferir que mudanças no perfil metabólico e hormonal interferem na fertilidade de vacas primíparas submetidas à sincronização da ovulação, visto que a taxa de prenhez não foi diferente entre as categorias de vacas.

## REFERÊNCIAS

- [1] Baruselli PS, Sales JNS, Sala R V, Vieira LM, Filho MFS. History , evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. *Anim Reprod* 2012;9:139–52.
- [2] Baruselli PS, Ferreira RM, Filho MFS, Bó GA. Review : Using artificial insemination v. natural service in beef herds. *Animal* 2018;12:45–52. doi:10.1017/S175173111800054X.
- [3] Baruselli PS, Jacomini JO, Sales JNS, Crepaldi GA. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. III Simpósio Int Reprodução Anim Apl Proc 2008;3:146–67.
- [4] DeRouen SM, Franke DE, Morrison DG, Wyatt WE, Coombs DF, White TW, et al. Parturition Body Condition and Weight Influences on Reproductive Performance of First-Calf Beef Cows. *J Anim Sci* 1994;72:1119–25.
- [5] Filho MFS, Torres-júnior JRS, Penteadó L, Gimenes LU, Ferreira RM, Ayres H, et al. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore ( *Bos indicus* ) heifers. *Anim Reprod Sci* 2010;118:182–7. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.10.004.
- [6] Barreiros TRR, Blaschi W, Santos GMG, Morotti F, Andrade ER, Baruselli PS, et al. Dynamics of follicular growth and progesterone concentrations in cyclic and anestrous suckling Nelore cows ( *Bos indicus* ) treated with progesterone , equine chorionic gonadotropin , or temporary calf removal. *Theriogenology* 2014;81:651–6. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.12.008.
- [7] Sales JNS, Bottino MP, Silva LACL, Giroto RW, Massoneto JPM, Souza JC, et al. Effects of eCG are more pronounced in primiparous than multiparous *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2016;86:2290–5. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.07.023.
- [8] Bottino MP. Efeito da suplementação com gonadotrofinas no crescimento final do folículo e na fertilidade de vacas *Bos indicus* submetidas à IATF. Universidade Federal de Lavras, 2014.
- [9] Ayres H, Ferreira RM, de Souza Torres-Júnior JR, Demétrio CGB, de Lima CG, Baruselli PS. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. *Livest Sci* 2009;123:175–9. doi:10.1016/j.livsci.2008.11.004.
- [10] Sales JNS, Iguma LT, Batista RITP, Quintão CCR, Gama MAS, Freitas C, et al. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *J Dairy Sci* 2015;98:1–14. doi:10.3168/jds.2014-8858.
- [11] Maioli MA, Nogueira G de P. Padronização da quantificação do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) em plasma bovino por ELISA. *Pesqui Veterinária Bras* 2017;37:1545–53. doi:10.1590/s0100-736x2017001200030.
- [12] Andrade GM, Coelho J, Perrini C, Del M, Meirelles V, Gebremedhn S, et al. The role of the PI3K-Akt signaling pathway in the developmental competence of bovine oocytes. *PLoS One* 2017;185:1–15.
- [13] Hoeck V Van, Bols PEJ, Binelli M, Leroy JLMR. Reduced oocyte and embryo quality

- in response to elevated non-esterified fatty acid concentrations : A possible pathway to subfertility ? *Anim Reprod Sci* 2014;x:1–11. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.07.015.
- [14] Westwood CT, Lean IJ, Garvin JK. Factors Influencing Fertility of Holstein Dairy Cows: A Multivariate Description. *J Dairy Sci* 2002;85:3225–37. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74411-1.
- [15] Thatcher WW, Bilby TR, Bartolome JA, Silvestre F, Staples CR, Santos JEP. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 2006;65:30–44. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.10.004.
- [16] Rensis F De, Garci I, Morini GG, Scaramuzzi RJ. Causes of declining fertility in dairy cows during the warm season. *Theriogenology* 2017:1–33. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.12.024.
- [17] Matoba S, Bender K, Fahey AG, Mamo S, Brennan L, Lonergan P, et al. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential. *Repr Fert Dev* 2014;26:337–45.
- [18] Emerick LL, Dias JC, Souza FA, Filho VRV, Andrade VJ. Retorno da atividade ovariana luteal cíclica de vacas de corte no pós-parto : uma revisão. *Rev Bras Reprodução Anim* 2009;33:203–12.
- [19] Simões LMS, Orlandi RE, Massoneto JPM, Jr LAS, Freitas BG, Bastos MR, et al. Exposure to progesterone previous to the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 2018;116:28–33. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.04.031.
- [20] Keisler D, Lucy MC. Perception and interpretation of the effects of undernutrition on reproduction. *J Anim Sci* 1996;74:1–17. doi:10.2527/1996.74suppl.
- [21] Gu L, Liu H, Gu X, Boots C, Moley KH, Wang Q. Metabolic control of oocyte development: linking maternal nutrition and reproductive outcomes. *Cell Mol Life Sci* 2015;72:251–71. doi:10.1007/s00018-014-1739-4.
- [22] Ruas J, Torres C, Borges L, Neto A, Carvalho G. Concentrações Plasmáticas de Colesterol , Glicose e Uréia em Vacas Zebuínas , em Relação à Condição Corporal e ao Status Reprodutivo. *Rev Bras Zootec* 2000;29:2036–42.
- [23] Stewart RE, Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE. 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. *J Anim Sci* 1995;73:3719–31.
- [24] Stick DA, Davis ME, Loerch SC, Simmen RCM. Relationship Between Blood Serum Insulin-Like Growth Factor I Concentration and Postweaning Feed Efficiency of Crossbred Cattle at Three Levels of Dietary Intake. *J Anim Sci* 1998;76:498–505.
- [25] Rhodes FM, Mcdougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL. Invited Review : Treatment of Cows with an Extended Postpartum Anestrous Interval. *J Dairy Sci* 2003;86:1876–94. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73775-8.
- [26] Baker RL, Peterson AJ, Amyes NC, Breier BH, Gluekman PD. Replicated selection for insulin-like growth factor-1 and body weight in mice. *Theor Appl Genet* 1991;81:685–92.
- [27] Wettemann RP, Bossis I. Energy Intake Regulates Ovarian Function in Beef Cattle. *Proc Am Soc Anim Sci* 2000;3:1–10. doi:10.2134/jas2000.77E-Suppl1c.
- [28] Sá Filho MF, Crespilho a M, Santos JEP, Perry G a, Baruselli PS. Ovarian follicle

- diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci* 2010;120:23–30. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.03.007.
- [29] Filho MFS, Santos JEP, Ferreira RM, Sales JNS, Baruselli PS. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol / progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology* 2011;76:455–63. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.02.022.
- [30] Sá Filho MF, Baldrighi JM, Sales JNS, Crepaldi G a, Carvalho JBP, Bó G a, et al. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* 2011;129:132–9. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.12.005.
- [31] Wiltbank MC, Gtimen A, Sartori R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 2002;57:21–52.
- [32] Murphy M, Boland MP, Roche JF. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. *J Reprod Fertil* 1990;90:523–33.
- [33] Yavas Y, Walton JS. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology* 2000;54:25–55.
- [34] Hess BW, Lake SL, Scholljegerdes EJ, Weston TR, Nayigihugu V, Molle JDC, et al. Nutritional controls of beef cow reproduction. *J Anim Sci* 2005;3684:90–106.
- [35] DiCostanzo A, Williams JE, Keisler DH. Effects of short-or long-term infusions of acetate or propionate on luteinizing hormone, insulin, and metabolite concentrations in beef heifers. *J Anim Sci* 1999;77:3050–6. doi:10.2527/1999.77113050x.
- [36] Hausman GJ, Barb CR, Lents CA. Leptin and reproductive function. *Biochimie* 2012;94:2075–81. doi:10.1016/j.biochi.2012.02.022.
- [37] Catunda AGV, Lima FRG, Lima ICS, Machado AAC, Gadelha CRF, Pereira ES, et al. O papel da leptina na reprodução dos ruminantes. *Rev Bras Reprodução Anim* 2014;38:3–9.