

EMILIANA DE OLIVEIRA SANTANA BATISTA

**Resposta ovariana, endócrina e molecular de novilhas
taurinas e zebuínas submetidas a diferentes níveis nutricionais
de ingestão de matéria seca**

São Paulo

2015

EMILIANA DE OLIVEIRA SANTANA BATISTA

Resposta ovariana, endócrina e molecular de novilhas taurinas e zebuínas submetidas a diferentes níveis nutricionais de ingestão de matéria seca

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

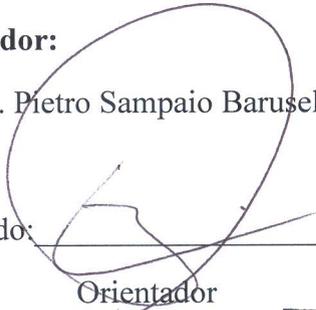
Area de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

De acordo:


Orientador

São Paulo
2015

Nº CLASSIFICAÇÃO
Nº TOMBO 034201

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3220
FMVZ

Batista, Emília de Oliveira Santana
Resposta ovariana, endócrina e molecular de novilhas taurinas e zebrúinas submetidas a diferentes níveis nutricionais de ingestão de matéria seca / Emília de Oliveira Santana Batista. -- 2015.
118 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Bos indicus. 2. Bos taurus. 3. Fígado. 4. Progesterona. 5. Metabolismo. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Respostas ovariana, endócrina e molecular de novilhas taurinas e zebuínas submetidas a diferentes desafios nutricionais", protocolado sob o nº 2565/2012, utilizando 64 (sessenta e quatro) novilhas, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 11/4/2012.

We certify that the Research "Ovarian, endocrine and molecular alterations from Bos taurus and Bos indicus heifers submitted to different nutritional challenges", protocol number 2565/2012, utilizing 64 (sixty four) heifers, under the responsibility Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/11/2012.

São Paulo, 12 de abril de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BATISTA, Emiliana de Oliveira Santana

Título: Resposta ovariana, endócrina e molecular de novilhas taurinas e zebuínas submetidas a diferentes níveis nutricionais de ingestão de matéria seca

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico

*Aos meus pais Isabel Cristina de Oliveira Santana
Batista e Milton de Oliveira Batista, pelo amor
incondicional dedicado a mim em todas as etapas da
minha vida até aqui.*

Agradeco

A Deus e a Nossa Senhora de Aparecida por saberem exatamente o que eu preciso, e desta forma sempre me protegerem e guiarem pelo melhor caminho.

Aos meus pais - Isabel Cristina de Oliveira Santana Batista e Milton de Oliveira Batista; e irmão - Milton de Oliveira Batista Filho, por acreditarem mais em mim do que eu mesma. Todo e qualquer agradecimento seria pouco perto de tudo que já fizeram por mim. Por todo amor, confiança, apoio e dedicação, esse trabalho com toda certeza é nosso. Amo vocês!

*Ao meu amor, Alex Souza. Meu lindo, ainda não sei como agradecer à Deus por tamanho presente em minha vida. Obrigada por tanto apoio, por tanto amor, por me fazer enxergar as coisas de forma mais simples. Obrigada por me ensinar cada vez mais todos os dias. Você definitivamente é uma das melhores pessoas que eu já conheci. Você é **muita** **linda** na minha vida!!! Mil vezes Te AMO!*

*Ao meu orientador, **prof. Pietro Sampaio Baruselli**. O senhor é exemplo de que um trabalho de excelência e humildade podem caminhar juntos. Além disso, é o workaholic mais calmo e educado que eu conheço o que torna qualquer trabalho mais simples de ser realizado. Obrigada por tantas oportunidades, e por ter me ensinado muito, não só com palavras, mas com seu exemplo. Tenho grande admiração pelo profissional e pessoa que o senhor é! Grande sorte a minha de ter tido a oportunidade de trabalhar com o senhor. Sou eternamente grata. Muito Obrigada!*

*Ao **prof. Francisco Rennó** pela sempre confiança e parceria neste e em tantos outros projetos. Muito obrigada por tudo!*

*Aos **professores Mario Binelli e Roberto Sartori**. Muito obrigada pelas sugestões na minha qualificação. Foram importantíssimas para a melhora deste trabalho.*

*Aos **professores Gabriel Bó, Mario Binelli, Marcos Chiaratti e Paula Papa** por terem aceitado participar da minha banca de defesa. É uma grande honra, muito obrigada.*

*Ao **Rodrigo Sala** e à **Mariana Ortolan**. Obrigada por tamanha dedicação com esse projeto. Vocês foram essenciais para os resultados que obtivemos com ele. Rodrigo, obrigada por me fazer repetir 1000 x a imagem no US (hehehe), você me ensinou demais! Muito Obrigada!*

Aos meus amigos, Tiagón (Tiago Antonio Del Valle) e Minerovix (Elmeson Ferreira de Jesus). Costumo dizer que sou um pouco sortuda, e ter cruzado com vocês no meu caminho foi muita sorte!! Além de grandes profissionais, vocês são grandes amigos. Dedicaram todo seu tempo em me ajudar durante esse projeto, e em outros realizados em parceria no LPBL. Só tenho a agradecer MUITÍSSIMO obrigada por tudo!

A Carolzita (Carol Macabelli) e ao Marquinhos (Marcos Chiaratti), obrigada por tanta paciência em me ensinar um pouquinho do “mundo molecular”. É muito bom trabalhar com vocês. São sinônimos de competência no que fazem, além de excelentes pessoas. Muito Obrigada!

A Mel, obrigada pela ajuda com as biópsias. Foi muito importante sua ajuda e conhecimento.

Aos estagiários: Bianca, Débora, Giuliana, Fernanda, Vitor. Foi muito bom trabalhar com vocês. Obrigada!

À querida amiga Harumi, obrigada pela amizade e pelo seu trabalho sempre impecável. Às queridas Tais e Roberta, obrigada pela sempre ajuda quando precisei. À querida dona Silva, com seu sempre sorriso no rosto, fazendo o dia de qualquer pessoa melhor.

Aos queridos Paulão, Lenon, Cris, Dona Dalva (Saudades de vocês), e a todos do Grupo LPBL - Cala, Catimbó, Bizão, Gu, Vítão, Filípi, Calomeni, Komixão, Pablo, Lenita. Não poderia ter escolhido melhor lugar para trabalhar durante este projeto. Muito Obrigada por tudo, principalmente por tornarem o ambiente de trabalho sempre o melhor possível!

Ao Chuchú e Dieguito Paraguaio. Obrigada por tanta ajuda. Serão sempre bem vindos por aqui. Dieguito, sempre serei sua mãe postica. Obrigada por tudo amigo!

Aos piétrinhos e pietrossauros: Laís-Maria (Laís Mendes Vieira), Jú (Júlia Soares), Brunão (Bruno Moura Monteiro), Manolo (Manoel Sá Filho), Gus (Gustavo Macedo), Marcião (Marcio Ferreira Mendanha), Karboxytos (Bruno Freitas), Bru (Bruna Guerreiro), Romulo Véio (Romulo Germano), Badá (Rodolfo Mingoti), Bernardo (Bernardo Bayeux), Evandro (Evandro Davanço), Robertinha (Roberta Ferreira) e Henderson (Henderson Ayres). Cada um de vocês em alguma etapa, e de diferentes formas, contribuíram grandemente para o meu crescimento pessoal e profissional durante este importante período da minha vida. Vou sentir bastante saudade do convívio diário e já sinto saudades dos que já foram. Levo comigo o melhor de cada um de vocês. Vocês são muito importantes para mim.

À Li (Lindsay Gimenes), obrigada pela amizade, conselhos e por ter cedido sua casa (ex-casa hehe) em um momento que eu muito precisei! Você é uma grande amiga.

À Gabi, Bia, Bol, Naxa e Giga vocês aguentaram muitos dispositivos de progesterona na garagem, e muita bagunça de hormônios e eppendorfs na cozinha, isso não é para qualquer um! (Hahaha). Obrigada por me incluírem na república e pela paciência com meus horários malucos em Pirassununga! Vocês foram demais!

À Milena, Jú, Jú-Mega e Lari - vocês fizeram eu me sentir em casa! São muito especiais! Muito Obrigada!

À FAPESP e CnpQ pela bolsa auxílio e bolsa de doutorado concedida.

Por fim, às lindinhas novilhas que trabalharam muito comigo durante este experimento. Principalmente à Nelore 3618. Muito Obrigada!

"Todo mundo é um gênio. Mas se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em árvores, ele passará toda sua vida acreditando ser estúpido"

(Albert Einstein)

RESUMO

BATISTA, E. O. S. **Resposta ovariana, endócrina e molecular de novilhas taurinas e zebuínas submetidas a diferentes níveis nutricionais de ingestão de matéria seca** [Ovarian endocrine and molecular responses in taurus and zebu heifers submitted to different levels of dry matter intake]. 2015. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O objetivo deste estudo foi avaliar a dinâmica folicular ovariana, a concentração circulante de progesterona (P4) e a expressão hepática de genes (*AKR1C4*, *AKR1D1*, *CYP3A4*, *CYP2C19*, *SRD5A1*, *SRD5A3*) relacionados ao metabolismo de P4 durante protocolo de sincronização para IATF em novilhas Nelore (n = 16) e Holandesas (n = 16) submetidas a alto (ACMS) e baixo (BCMS) consumo de matéria seca/energia de acordo com o (NRC, 2001). O experimento foi realizado em arranjo fatorial 2 x 2 e delineamento cross-over. A dieta experimental foi fornecida por um período de 34 dias. Os animais foram pré-sincronizados com duas aplicações de cloprostenol sódico (500 µg, i.m. PGF₂α, Sincrocio[®], Ourofino Agronegócio), com intervalo de 12 dias (D -24 e D-12). Duas doses adicionais de PGF₂α (18 e 12 h) foram administradas antes da inserção do dispositivo (D0). No D0, os animais receberam um dispositivo intravaginal de P4 (CIDR[®], Zoetis, Brasil), 2 mg i.m. de benzoato de estradiol (BE, SincrodioI[®], Ourofino Agronegócio) e mais uma dose de PGF₂α. Após 8 dias, o dispositivo de P4 foi retirado e 24 h após foi administrado i.m. 1 mg de BE. Foram realizados exames ultrassonográficos a cada 24h durante o período de permanência do dispositivo de P4, a cada 12h da retirada do dispositivo até a ovulação, e no D14 e D17 para mensurar o volume do corpo lúteo (CL). Foram realizadas coletas de sangue diárias do D0 ao D10. Uma única réplica foi realizada para biópsia hepática, que foi feita 48 h após a inserção de dispositivo de P4 (D2). Para os dados de dinâmica folicular e concentrações hormonais, os resultados foram analisados pelo PROC MIXED, e para os dados de expressão gênica pelo PROC GLIMMIX do SAS 9.3, e apresentados como média ± EPM. O número de folículos recrutados foi maior em novilhas Nelore que Holandesas (42,1 ± 3,4 vs. 23,5 ± 3,3, P < 0,001). Entretanto, não se verificou efeito da dieta no número de folículos recrutados (ACMS = 33,7 ± 3,3 vs. BCMS = 31,9 ± 3,3; P = 0,62). O diâmetro máximo do folículo dominante

(mm) foi maior em novilhas Holandesas que novilhas Nelore ($14,5 \pm 0,4$ vs. $13,0 \pm 0,4$, $P = 0,009$); e em animais com ACMS, que com BCMS ($14,8 \pm 0,4$ vs. $12,7 \pm 0,4$; $P = 0,0004$). Ainda, novilhas Holandesas apresentaram maior volume do CL (mm^3) que novilhas Nelore (6195 ± 427 vs. 3507 ± 461 ; $P < 0,0001$). Novilhas submetidas à BCMS apresentaram maior concentração plasmática de P4 ao longo do protocolo que novilhas submetidas à ACMS ($P < 0,05$), sendo isto mais evidente em novilhas Nelore (raça * dieta, $P = 0,05$). Novilhas Holandesas tiveram maior expressão de mRNA para *SRD5A1*, *AKR1C4* e *AKR1D1* ($P < 0,05$), que novilhas Nelore. Entretanto, a expressão de mRNA para *CYP3A4* foi maior em novilhas Nelore que Holandesas ($P < 0,0001$). A expressão de mRNA para *AKR1D1* foi maior em novilhas submetidas à ACMS comparada à BCMS ($P = 0,004$), e a expressão de mRNA para *AKR1C4* foi maior em novilhas sob BCMS comparada à ACMS ($P = 0,01$). Os dados são indicativos de que pode existir característica inerente à raça e à dieta quanto à metabolização de P4, resposta folicular e modulação na expressão de genes envolvidos com a metabolização de P4 em fêmeas bovinas submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de P4.

Palavras – chave: *Bos indicus*. *Bos taurus*. Fígado. Progesterona. Metabolismo

ABSTRACT

BATISTA, E. O. S. [Ovarian, endocrine and molecular responses in taurus and zebu heifers submitted to different levels of dry matter intake] Resposta ovariana, endócrina e molecular de novilhas taurinas e zebuínas submetidas a diferentes níveis nutricionais de ingestão de matéria seca. 2015. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The objective of this study was to evaluate the circulating progesterone (P4) concentration, ovarian follicular dynamics, and liver-gene expression of genes (*CYP2C19*, *CYP3A4*, *SRD5A1*, *SRD5A3*, *AKR1C4*, *AKR1D1*) associated to P4 metabolism in Nelore (n = 16) and Holstein (n = 16) heifers, kept in high (HDM) or low (LDM) dry matter intake according NRC (2001) during a timed AI protocol. The experiment was performed in a cross-over factorial 2 x 2 design. The experimental diet was fed for a period of 34 days. Heifers were presynchronized with two prostaglandin treatments (500 µg, i.m. PGF₂α, Sincrocio[®], Ourofino Agronegócio) given 12 days apart (D-14 e D-12). Two further PGF₂α treatments were also performed 18 and 12 h before device insertion (D0). At the beginning of the synchronization protocol (D0), all heifers received an intravaginal P4 device (CIDR[®], Zoetis, Brazil), 2 mg i.m. of estradiol benzoate (BE, SincrodioI[®], Ourofino Agronegócio) and a PGF₂α treatment. Eight days later, the P4 device was removed and 1 mg of BE was applied i.m. 24h later. Ultrasound exams took place at every 24h throughout the P4 device insertion period, at 12h intervals from device removal to ovulation, and again on D14 and D17 to measure corpus luteum (CL) volume. Daily blood sampling was performed from D0 to D10. A single liver biopsy was done 48 h after P4 device insertion (D2). The PROC MIXED procedure was used to analyze data from follicular dynamics and hormonal profiles, and gene expression records were analyzed by the PROC GLIMMIX of SAS 9.3. Results are presented as mean ± SEM. The number of recruited follicles was greater in Nelore than in Holstein heifers (42.1 ± 3.4 vs. 23.5 ± 3.3, P < 0.001). The diameter of the dominant follicle (mm) was greater in Holstein than in Nelore heifers (14.5 ± 0.4 vs. 13.0 ± 0.4, P = 0.009) and also for HDM heifers than for LDM (14.8 ± 0.4 vs. 12.7 ± 0.4; P = 0.0004). In addition, Holstein heifers had greater CL volume (mm³) than Nelore (6195 ± 427 vs. 3507 ± 461; P < 0.0001). Heifers submitted to BCMS

have greater concentrations of P4 during the protocol than heifers submitted to ACMS ($P < 0.05$), and this is most evident in Nelore heifers (breed * diet, $P < 0,05$). Holstein heifers had greater mRNA expression of *SRD5A1*, *AKR1C4* and *AKR1D1* ($P < 0.05$) than Nelore heifers. The mRNA expression of the gene *CYP3A4* was greater though in Nelore compared Holsteins ($P < 0.0001$). Furthermore, the mRNA expression of *AKR1D1* was greater in heifers on HDM than in LDM ($P = 0.004$). In contrast, the mRNA expression of *AKR1C4* was more expressed in heifers on LDM compared to HDM ($P = 0.01$). In conclusion, these results suggest that both cattle breed as well as level of dry matter intake can alter P4 metabolism, follicular dynamics and gene expression in heifers supplemented with exogenous P4 during synchronization programs.

Keywords: *Bos indicus*. *Bos taurus*. Liver. Progesterone. Metabolism

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Modelo fisiológico dos fatores que regulam a concentração de progesterona (P4) em vacas leiteiras lactantes. 37
- Figura 2. Órgãos envolvidos na produção, metabolismo, e excreção de progesterona (P4); e metabólitos encontrados na urina e fezes. Os metabólitos encontrados nas fezes estão na forma livre, enquanto que os metabólitos encontrados na urina são geralmente conjugados com glucoronídeos e alguns sulfatos..... 38
- Figura 3 - Biotransformação de progesterona (P4) nos hepatócitos 39
- Figura 4 - Modelo hipotético gráfico das vias envolvidas na primeira fase de biotransformação de progesterona (P4) nos hepatócitos. Em uma das vias, a P4 é inativada pelas enzimas citocromo P450 2C (CYP2C) e citocromo P450 3A (CYP3A), e a outra via envolve as enzimas 5 – alfa (AKR1C4, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A3) e 5 beta redutases (AKR1D1). Ambas as vias envolvem a formação de metabólitos hidrofílicos. 40
- Figura 5 - Novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*; 24 ± 0,4 meses de idade) e da raça Holandesa (*Bos taurus*; 18,0 ± 0,5 meses de idade) que foram submetidas à alta ingestão de matéria seca durante período experimental..... 57
- Figura 6 - Novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*, 24 ± 0,4 meses de idade) e da raça Holandesa (*Bos taurus*;18,0 ± 0,5 meses de idade) que foram submetidas à baixa ingestão de matéria seca durante período experimental..... 57
- Figura 7 - Piquetes em que as novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*, 24 ± 0,4 meses de idade) e Holandesa (*Bos taurus*, 18,0 ± 0,5 meses de idade) permaneceram alojadas durante todo o período experimental..... 58

Figura 8 - Área de sombreamento igualmente acessível nos piquetes em que as novilhas da raça Nelore (<i>Bos indicus</i> , 24 ± 0,4 meses de idade) e Holandesa (<i>Bos taurus</i> , 18,0 ± 0,5 meses de idade) permaneceram alojadas durante todo o período experimental.....	59
Figura 9 - Área de cocho igualmente disponível nos piquetes em que as novilhas da raça Nelore (<i>Bos indicus</i> , 24 ± 0,4 meses de idade) e Holandesa (<i>Bos taurus</i> , 18,0 ± 0,5 meses de idade) permaneceram alojadas durante todo o período experimental.....	59
Figura 10 - Delineamento experimental	62
Figura 11 - Instrumento automático Pro-Mag TM Ultra e agulha Pro-Mag TM Ultra I 2.5 (Ecomed, Brasil) utilizados para o procedimento de biópsia hepática.....	64
Figura 12 - Diâmetro do folículo dominante (mm) de novilhas da raça Nelore (<i>Bos indicus</i>) e da raça Holandesa (<i>Bos taurus</i>) submetidas às dietas de alta e baixa ingestão de matéria seca/energia, sincronizadas com benzoato de estradiol (BE) e dispositivo intravaginal de progesterona (P4). Dados apresentados como média ± EPM.....	75
Figura 13 - Diâmetro do folículo dominante (mm) de novilhas da raça Nelore (<i>Bos indicus</i>) e da raça Holandesa (<i>Bos taurus</i>) submetidas à dieta de alta e baixa ingestão de matéria seca/energia durante o protocolo de sincronização com benzoato de estradiol (BE) e dispositivo intravaginal de progesterona (P4), independente da raça avaliada. Dados apresentados como média ± EPM.	76
Figura 14 - Diâmetro do folículo dominante de novilhas da raça Nelore (<i>Bos indicus</i>) e da raça Holandesa (<i>Bos taurus</i>) tratadas com benzoato de estradiol (BE) e dispositivo intravaginal de progesterona (P4), independente da dieta fornecida. Dados apresentados como média ± EPM.....	77
Figura 15 - Taxa de ovulação ao final do protocolo de sincronização da ovulação em novilhas da raça Nelore (<i>Bos indicus</i>) submetidas à dieta de alta (n = 16) e baixa (n = 16) ingestão de matéria seca/energia e em novilhas da raça Holandesa (<i>Bos taurus</i>) submetidas à dieta de alta (n = 16) e baixa (n = 16) ingestão de matéria seca.....	78

- Figura 16 - Concentração plasmática de progesterona (P4) durante protocolo de sincronização da ovulação em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à alta e baixa ingestão de matéria seca/energia. Dados apresentados como média \pm EPM..... 81
- Figura 17 - Concentração plasmática de progesterona (P4) após a retirada do dispositivo intravaginal de P4 (D8) em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à alta e baixa ingestão de matéria seca/energia. Sangue colhido a cada 3 h do momento da retirada do dispositivo até 12 h. Dados apresentados como média \pm EPM. 82
- Figura 18 - Concentração plasmática de progesterona (P4) em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*), submetidas à alta (n = 8) e baixa ingestão de matéria seca/energia (n = 8); e novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*), submetidas à alta (n = 8) e baixa (n = 8) ingestão de matéria seca/energia. 83
- Figura 19 - Expressão relativa de mRNA dos genes A. *CYP2C19* (citocromo P450, família 2, sub-família C, polipetídeo 19); B. *CYP3A4* (citocromo P450, subfamília IIIA, polipetídeo 4) em novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à dieta de alta (n = 7) e baixa ingestão de matéria seca (n = 6); e novilhas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à dieta de alta (n = 7) e baixa ingestão de matéria seca (n = 7)..... 84
- Figura 20 - Expressão relativa de mRNA de *AKR1D1* (aldo – ceto – redutase família 1, membro D1), e *AKR1C4* (aldo – ceto – redutase família 1, membro C4) em novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à dieta de alta (n = 7) e baixa ingestão de matéria seca (n = 6); e novilhas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à dieta de alta (n = 7) e baixa ingestão de matéria seca (n = 7). 85
- Figura 21 - Expressão relativa de mRNA de *SRD5A1* e *SRD5A3* em novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à dieta de alta (n = 7) e baixa ingestão de matéria seca (n = 6); e novilhas Nelore submetidas à dieta de alta (n = 7) e baixa ingestão de matéria seca (n = 7)..... 86

Figura 22 - Modelo hipotético gráfico de fatores envolvidos no metabolismo de progesterona (P4) em novilhas <i>Bos indicus</i> (Nelore) e <i>Bos taurus</i> (Holandesa) durante protocolo de sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de P4.....	96
Figura 23 - Modelo hipotético das enzimas envolvidas na primeira fase do metabolismo hepático de progesterona (P4) em novilhas da raça Nelore (<i>Bos indicus</i>), independente da dieta fornecida.....	98
Figura 24 - Modelo hipotético das enzimas envolvidas na primeira fase do metabolismo hepático de progesterona (P4) em novilhas da raça Holandesa (<i>Bos taurus</i>), independente da dieta fornecida.....	99
Quadro 1 - Nomenclatura, <i>primers forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R), sequência de <i>primers</i> , identificação representativa (ID) e números de pares de bases dos genes.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados climáticos de temperatura e precipitação média da cidade de Pirassununga – SP, janeiro a maio de 2013.....	53
Tabela 2 -	Peso médio (PV), ganho de peso diário (GDP), e escore de condição corporal (ECC) durante o período experimental de novilhas da raça Nelore (<i>Bos indicus</i>) e Holandesa (<i>Bos taurus</i>) submetidas à dieta de alta e baixa ingestão de matéria seca/energia. Dados apresentados como média \pm E.P.M.....	74
Tabela 3 -	Início de nova onda folicular (IONDA), número de folículos à emergência de onda (NFOL), em novilhas da raça Nelore (<i>Bos indicus</i>) e da raça Holandesa (<i>Bos taurus</i>), submetidas à alta e baixa ingestão de matéria seca/energia. Dados apresentados como média \pm E.P.M.....	74
Tabela 4 -	Diâmetros do folículo dominante no dia 8 (FD8), folículo dominante no dia 10 (FD10), máximo diâmetro do folículo dominante (DMFD), folículo ovulatório (FO), taxa de crescimento folicular e (TC), em novilhas da raça Nelore (<i>Bos indicus</i>) e da raça Holandesa (<i>Bos taurus</i>) submetidas à alta e baixa ingestão de matéria seca/energia. Dados apresentados como média \pm E.P.M.....	74
Tabela 5 -	Momento da ovulação (MO) e manifestação do comportamento de estro (ME) de novilhas da raça Nelore (<i>Bos indicus</i>) e da raça Holandesa (<i>Bos taurus</i>), submetidas à baixa e a alta ingestão de matéria seca. Dados apresentados como média \pm E.P.M.....	78
Tabela 6 -	Diâmetro de corpo lúteo no dia 14 (CLD14), no dia 17 (CLD17); e volume do CL no dia 14 (VOL14) e dia 17 (VOL17) do protocolo hormonal de novilhas da raça Nelore (<i>Bos indicus</i>) e Holandesa (<i>Bos taurus</i>) submetidas à dieta de alta e baixa ingestão de matéria seca/energia. Dados apresentados como média \pm E.P.M.....	79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 HIPÓTESES	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 REVISÃO DE LITERATURA	29
4.1 A IMPORTÂNCIA DA NUTRIÇÃO NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS.....	29
4.2. INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO NA DINÂMICA FOLICULAR	29
4.3 A INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO NA CONCENTRAÇÃO HORMONAL	31
4.3.1 Hormônios esteroides.....	31
4.3.2 Metabolismo de P4.....	34
4.3.3 Gonadotrofinas	41
4.4. SIMILARIDADES E DIFERENÇAS NA FISIOLOGIA REPRODUTIVA EM <i>BOS TAURUS</i> E <i>BOS INDICUS</i>	41
4.4.1 COMPORTAMENTO ESTRAL.....	41
4.4.2 IDADE À PUBERDADE.....	42
4.4.3 NÚMERO DE ONDAS FOLICULARES E POPULAÇÃO FOLICULAR ...	43
4.4.4 DIVERGÊNCIA FOLICULAR.....	45
4.4.5 AQUISIÇÃO DA CAPACIDADE OVULATÓRIA	46
4.4.6 DIAMETRO MÁXIMO DO FOLÍCULO DOMINANTE, FOLÍCULO OVULATÓRIO E CORPO LÚTEO	47
4.4.7 HORMÔNIOS ESTERÓIDES, GONADOTROFINAS E O ENVOLVIMENTO DO EIXO SOMATOTRÓFICO	47
4.4.7.1 Estradiol e Progesterona	47
4.4.7.2 Glicose, Insulina e IGF-1	48
4.4.7.3 Gonadotrofinas.....	49
4.4.7.4 Hormônio Anti-Mülleriano (AMH).....	49
4.4.8 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF).....	50
4.4.8.1 Tratamentos com P4 e E2.....	50
5. MATERIAL E MÉTODOS	53
5.1 LOCAL.....	53
5.2 ANIMAIS DO EXPERIMENTO	53

5.3 DIETA EXPERIMENTAL	54
5.4 SINCRONIZAÇÃO DA EMERGÊNCIA DA ONDA FOLICULAR	60
5.5 ULTRASSONOGRAFIA E DINÂMICA FOLICULAR	60
5.6 COLETA DE SANGUE E DOSAGEM HORMONAL.....	61
6. RADIOIMUNOENSAIO	63
7. BIÓPSIA HEPÁTICA	63
8. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	65
8.1 LOCAL.....	65
8.2 EXTRAÇÃO DE RNA	65
8.3 TRATAMENTO COM DNASE E SÍNTESE DE cDNA	66
8.4 DESENHO DE PRIMERS	66
8.5 VALIDAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i>	67
9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
10. RESULTADOS.....	71
10.1 DINÂMICA FOLICULAR.....	71
10.2 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE P4	79
11. DISCUSSÃO	87
12 CONCLUSÃO	95
13. CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
REFERÊNCIAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

O uso estratégico da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* como ferramenta de melhoramento genético promove melhora na eficiência reprodutiva, antecipando a concepção e aumentando a taxa de prenhez ao final da estação de monta (BARUSELLI, 2002; PENTEADO et al., 2005). Em vacas leiteiras, os protocolos de sincronização da ovulação para IATF colaboram com o aumento da taxa de serviço e taxa de prenhez, melhorando a eficiência reprodutiva do rebanho (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995; PURSLEY; SILCOX; WILTBANK, 1998; WILTBANK et al., 2011). Em fêmeas *Bos taurus*, particularmente em vacas da raça Holandesa, tem sido demonstrado que durante protocolo de sincronização da ovulação a maior concentração de progesterona (P4) durante a fase de crescimento do folículo dominante acarreta em maior taxa de concepção após IATF (WILTBANK et al., 2011). No entanto, em fêmeas *Bos indicus* (zebu), em algumas situações, a elevada concentração de P4 durante os protocolos de sincronização da ovulação tem apresentado efeitos negativos na taxa de crescimento do folículo dominante, e conseqüentemente na taxa de ovulação, comprometendo a eficiência dos programas reprodutivos que empregam a sincronização da ovulação (CARVALHO et al., 2008; MANTOVANI et al., 2010).

Sabe-se que a concentração de esteroides no sangue correlaciona-se positivamente com o tamanho das estruturas ovarianas - folículo dominante e corpo lúteo (CL; VASCONCELOS et al., 2001; PERRY et al., 2014). No entanto, embora tenha sido observado maior diâmetro do folículo dominante e do CL em vacas Holandesas de alta produção, a concentração de esteroides circulante é menor em comparação às novilhas da mesma raça (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004; SARTORI et al., 2004). De forma similar, sabe-se que o tamanho do folículo dominante e do CL são maiores em raças taurinas comparadas às zebuínas (CARVALHO et al., 2008; GIMENES et al., 2009; BASTOS et al., 2010), o que poderia sugerir maior produção de hormônios esteroides nas fêmeas taurinas, revisado por BARUSELLI; GIMENES; SALES (2007); SARTORI et al., (2010). No entanto, tem sido observada maior

concentração circulante de hormônios esteroides em fêmeas zebuínas, quando comparada às taurinas submetidas às mesmas condições de manejo (CARVALHO et al., 2008; BASTOS et al., 2010).

O que determina a concentração circulante de P4 é o resultado da sua produção, principalmente pelo CL, e catabolismo que ocorre principalmente no fígado (WILTBANK et al., 2012). Desta forma, a maior concentração circulante de P4 observada em fêmeas zebuínas poderia ser explicada pela maior capacidade esteroidogênica do CL e/ou pela menor metabolização hepática. Por possuir menor tamanho de CL, e assim, possivelmente menor quantidade de células que secretam P4, provavelmente fêmeas zebuínas não apresentem maior produção de P4 que fêmeas taurinas. Corroborando esta hipótese, dados da literatura são indicativos de que há maior capacidade esteroidogênica do CL de fêmeas taurinas (RANDEL, 1976; SEGERSON et al., 1984). No entanto, são necessários trabalhos adicionais para confirmar esta hipótese.

Em relação à metabolização hepática, sabe-se que o aumento de ingestão de matéria seca em vacas leiteiras de alta produção, aumenta o fluxo sanguíneo hepático e, conseqüentemente a metabolização dos hormônios esteroides no fígado (SANGSRITAVONG et al., 2002; WILTBANK et al., 2006), reduzindo a concentração circulante de P4 e E2. No entanto, há relatos que, independentemente da dieta (alta ou baixa ingestão de matéria seca), vacas secas *Bos indicus* apresentem maior concentração de P4 no dia 7 do ciclo estral, que vacas secas *Bos taurus* (BASTOS, 2012). Com esta informação, pode-se especular que as diferenças na metabolização hepática de P4 possa ser uma característica inerente ao grupo genético, como discutido por BASTOS (2012). Neste contexto, há informações sobre o envolvimento de enzimas hepáticas que regulam o metabolismo de P4 em fêmeas *Bos taurus* (LEMLEY et al., 2008; LEMLEY et al., 2010b; LEMLEY et al., 2010a; VIEIRA et al., 2012; HART et al., 2014; MCCRACKEN et al., 2015; VOELZ et al., 2015). Neste grupo genético foi observado que a insulina pode inibir a expressão e a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo hepático de P4 (LEMLEY et al., 2008). Entretanto, não há informações sobre a regulação do metabolismo de P4 realizado por estas enzimas em fêmeas *Bos indicus*, que possivelmente poderiam ajudar a explicar tais diferenças na metabolização de esteroides entre os dois grupos genéticos.

Inicialmente, os principais metabólitos descritos na literatura resultantes do catabolismo de P4 foram 21-hidroxiprogesterona e 6 β -hidroxiprogesterona, que são resultado da inativação de P4 pelas enzimas CYP2C e CYP3A, respectivamente (MURRAY, 1991; MURRAY, 1992). Assim, grande parte dos estudos realizados com fêmeas *Bos taurus* avaliou somente estas duas enzimas envolvidas no catabolismo de P4 (LEMLEY et al., 2008; LEMLEY et al., 2010b; VIEIRA et al., 2012; MCCRACKEN et al., 2015). Entretanto, estes estudos iniciais foram realizados *in vitro* (MURRAY, 1991; MURRAY, 1992), e geralmente os resultados encontrados no metabolismo *in vitro* são diferentes dos resultados encontrados *in vivo*. A maioria dos metabólitos encontrados no sangue, urina e fezes são provenientes de caminhos que envolvem as enzimas redutases – AKR1C e AKR1D. Assim, o caminho envolvendo estas enzimas parece ser a principal via de catabolismo hepático de P4 *in vivo* (STUPNICKI; WILLIAMS, 1968; CHANTILIS et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1997).

Desta forma, este estudo tem o intuito de gerar informações para tentar compreender as diferenças sobre as bases da fisiologia reprodutiva entre fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* relacionadas ao metabolismo de P4 durante protocolo de sincronização da ovulação para a IATF. Ainda, procura verificar a influência da alta e baixa ingestão de matéria seca no metabolismo de P4 em novilhas de ambos os grupos genéticos e as possíveis diferenças na regulação de enzimas relacionadas ao metabolismo de esteroides no fígado. Essas informações podem ajudar explicar as diferentes respostas aos tratamentos hormonais, e possibilitar a aplicação de biotecnologias da reprodução respeitando as particularidades dos diferentes grupos genéticos. Ainda, podem colaborar na programação de novos protocolos de sincronização para IATF, como também para a superovulação, a aspiração folicular e a transferência de embriões. Essas informações são importantes para otimizar o emprego destas biotecnologias nos sistemas de produção de carne e leite e, conseqüentemente, a eficiência reprodutiva dos rebanhos.

2 HIPÓTESES

- Novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) apresentam menor taxa de crescimento e diâmetro do folículo dominante durante o protocolo de sincronização com dispositivo intravaginal de P4 que novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*). Além disso, independente da raça, novilhas submetidas à alta ingestão de matéria seca/energia apresentam maior taxa de crescimento e diâmetro do folículo dominante, que novilhas submetidas à baixa ingestão de matéria seca/energia.
- Novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à dieta de baixa ingestão de matéria seca/energia apresentam maior concentração de P4 durante o protocolo de sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de P4, em relação aos seus respectivos grupos genéticos submetidos à dieta de alta ingestão de matéria seca/energia. Ainda, independente da dieta, novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) apresentam maior concentração de P4 durante o protocolo de sincronização da ovulação, em relação às novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*).
- Novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*), independente da dieta fornecida (alta ou baixa ingestão de matéria seca/energia) apresentam maior abundância de transcritos para os genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo hepático de P4 em comparação às novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da alta e baixa ingestão de matéria seca/energia no perfil de dinâmica folicular, hormonal e molecular em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*), submetidas a mesmo protocolo hormonal para sincronização da ovulação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da alta e baixa ingestão de matéria seca/energia em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*), submetidas a mesmo protocolo hormonal para sincronização da ovulação sobre:

1) Dinâmica folicular refletida pelo:

- Número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular
- Início da emergência da onda folicular
- Taxa de crescimento do folículo dominante
- Diâmetro do folículo dominante
- Diâmetro do folículo ovulatório
- Momento do estro e da ovulação
- Taxa de ovulação
- Diâmetro e volume do CL

2) Perfil hormonal, avaliando-se durante o protocolo hormonal:

- Concentração plasmática de P4

3) Perfil molecular refletido pelo metabolismo de P4 durante o protocolo hormonal, pela:

- Abundância de transcritos dos genes relacionados ao metabolismo de P4 hepático: *CYP2C19* (cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19); *CYP3A4* (cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4), *AKR1D1* (aldo-keto reductase family 1,

member D1), *AKR1C4* (aldo-keto reductase family 1, member C4),
SRD5A1 (steroid – 5 – alpha – reductase, alpha polypeptide 1) e
SRD5A3 (steroid – 5 – alpha – reductase 3).

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 A IMPORTÂNCIA DA NUTRIÇÃO NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS

Tanto o excesso (SANTOS, 1998; WILTBANK et al., 2006; SANTOS; CERRI; SARTORI, 2008), como a falta de energia (KEISLER; LUCY, 1996; BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003) podem afetar diretamente o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas. O efeito da dieta na reprodução pode ser evidenciado no padrão de crescimento folicular, concentração de hormônios esteroides (MARTINS et al., 2008; BASTOS et al., 2010; SALES, 2011; SURJUS, 2013), atividade secretória do útero (ROBINSON, 2006; LEROY et al., 2008) e idade à puberdade (SCHILLO, 1992). O baixo ou excessivo consumo de vitaminas e minerais também tem seus efeitos na reprodução; e tem sido relacionado ao baixo desempenho reprodutivo de bovinos (SANTOS; AMSTALDEN, 1998).

O estudo das particularidades fisiológicas em fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus* (CARVALHO et al., 2008; GIMENES et al., 2009; GIMENES, 2010; SILVA-SANTOS et al., 2011; SOARES et al., 2011; SATRAPA et al., 2013) e em resposta à diferentes níveis nutricionais de ingestão de matéria seca/energia (MOLLO et al., 2007; MARTINS et al., 2008; BASTOS et al., 2010; SALES, 2011; PRATA, 2013; SURJUS, 2013) tem sido útil para o desenvolvimento de protocolos específicos, ou estratégias de manejo reprodutivo para maximizar a produção nestes grupos genéticos. Ainda, estes estudos comprovam que a manipulação correta da dieta e do manejo alimentar poderá refletir em uma melhora no desempenho reprodutivo destes animais.

4.2. INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO NA DINÂMICA FOLICULAR

A dinâmica folicular é um processo contínuo de crescimento e regressão de um grupo de folículos antrais. A maioria destes folículos sofrerá atresia, e um único folículo será selecionado para continuar o desenvolvimento e chegar à eventual ovulação (LUCY, M C et al., 1992; ADAMS; PIERSON, 1995). O período que envolve a emergência folicular até o folículo alcançar o estágio pré-ovulatório tem sido relatado ser de 90 dias (FAIR, 2003). Embora os

mecanismos que estimulem o número de folículos primordiais que serão recrutados em uma onda folicular não estejam ainda completamente entendidos, há indícios que estejam envolvidos os seguintes fatores de crescimento: BMP4, BMP7, BMP15, GDF9, bFGF, FIG-F (BINELLI; MURPHY, 2009; AERTS; BOLS, 2010). A partir da formação do antro, sabe-se que além de fatores de crescimento: FGF8, IGF1 e IGF2 (BINELLI; MURPHY, 2009; AERTS; BOLS, 2010), o desenvolvimento folicular passa a ser dependente da ação de gonadotrofinas (FSH e LH).

No desenvolvimento da emergência da onda folicular até a ovulação, tanto o excesso, quanto a escassez de nutrientes podem influenciar o crescimento folicular final (LEROY et al., 2008). Em relação ao efeito da quantidade de energia fornecida na população folicular ovariana, os resultados são ainda contraditórios. Há relatos que o excesso de energia na dieta aumenta o número de folículos recrutados (GUTIÉRREZ et al., 1997; GONG et al., 2002), como também há estudo em que fêmeas submetidas à dieta *ad libitum* apresentaram menor número de folículos ovarianos (MOLLO et al., 2007).

Em relação a taxa de crescimento final do folículo foi demonstrado que o excesso da ingestão de matéria seca aumenta a taxa de crescimento folicular em novilhas (ARMSTRONG et al., 2001; MOLLO et al., 2007). Neste contexto, foi observado que o aumento da energia da dieta reduz a concentração de mRNA de IGFBP-2 e 4 em pequenos folículos antrais, que por sua vez aumentam a biodisponibilidade local para produção de IGF-2, o qual sabe-se que tem grande importância no desenvolvimento folicular (WEBB et al., 2004).

No entanto, quando a dieta é fornecida abaixo dos níveis de manutenção há comprometimento no crescimento folicular (MURPHY et al., 1991). A restrição aguda da dieta reduz as concentrações sistêmicas de hormônios metabólicos (insulina e IGF-1), o que resulta em maior número de folículos anovulatórios, devido a menor secreção de E2 e diâmetro reduzido destes folículos, que reflete em falhas na ovulação (BOSSIS et al., 1999; MACKEY et al., 1999; BOSSIS et al., 2000; MACKEY et al., 2000). Corroborando estas informações, recentemente foi observado que em vacas em lactação, e em fêmeas submetidas a baixo plano nutricional, o comprometimento no ambiente metabólico diminuiu a expressão da proteína STAR (proteína reguladora aguda

da esteroidogênese), e contribui para reduzir a capacidade do folículo dominante em produzir E2 (WALSH et al., 2012). Desta forma, a circulação de metabólitos circulantes pode ter influência direta na função das células da granulosa e competência do desenvolvimento do oócito (LEROY et al., 2004a; LEROY et al., 2004b).

4.3 A INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO NA CONCENTRAÇÃO HORMONAL

4.3.1 Hormônios esteroides

A interação que ocorre entre as células da granulosa e da teca que compõem o folículo ovariano é responsável pela produção esteroidogênica ovariana. Até a onda de LH, a concentração de 17β - estradiol sintetizado pelas células da granulosa após aromatização da testosterona (ou 4-androstenediona) proveniente das células da teca é alta no fluido folicular (FORTUNE; QUIRK, 1988). Posteriormente, a onda de LH estimula a transformação das células da teca e células da granulosa em células luteínicas, que então iniciam a produção de P4 ao invés de 17β - estradiol, acompanhado por um declínio na expressão de mRNA das enzimas P450 17α - hidroxilase (enzima importante na síntese de testosterona) e P450 aromatase (enzima importante na síntese de 17β estradiol); (CHAFFIN; DISSEN; STOUFFER, 2000; KOMAR et al., 2001; WALSH et al., 2012).

No CL, o controle da produção de P4 ocorre basicamente pelo envolvimento das células luteínicas grandes e pequenas (MURPHY, 2000). Há basicamente três tipos celulares que compõem o CL: células luteínicas esteroidogênicas grandes, células luteínicas esteroidogênicas pequenas (RODGERS, 1982; RODGERS; OSHEA; BRUCE, 1983; RODGERS; O'SHEA; BRUCE, 1984; HOYER; NISWENDER, 1985; 1986; HOYER et al., 1988; NISWENDER et al., 1994) e células vasculares endoteliais. Há também outros tipos celulares como fibroblastos e células imunes (PATE; KEYES, 2001).

As células luteínicas pequenas originam-se das células da teca, e contém receptores de LH que respondem à este hormônio com aumento na secreção de P4. As células luteínicas grandes originam-se da granulosa. Embora as células luteínicas grandes tenham receptores de LH, elas não

respondem à este hormônio com aumento na concentração de P4 (NISWENDER, 2002).

Em bovinos, as células luteínicas pequenas representam um décimo do volume das células luteínicas grandes (3.000 vs. 30.000 μm^3). Entretanto, há ao redor de 100 milhões de células luteínicas pequenas/g de tecido, comparada a 13,8 milhões de células luteínicas grandes, que representam desta forma ao redor de 3,5% do total do número de células em bovinos (O'SHEA; RODGERS; D'OCCHIO, 1989). No entanto, as células luteínicas grandes têm produção de P4 cem vezes maior que as células luteínicas pequenas (WILTBANK; BELFIORE; NISWENDER, 1993).

Na vaca, as concentrações de P4 continuam a aumentar até 14º dia do ciclo estral, mesmo sem que o volume do CL aumente significativamente após o dia 7 (SARTORI et al., 2004). O aumento na concentração de P4 circulante durante os primeiros sete dias é provavelmente devido à hipertrofia das células luteínicas grandes. Há também durante este período hiperplasia das células, muito provavelmente devido à proliferação de capilares endoteliais, o que pode explicar o fato do aumento na concentração circulante de P4, sem aumento no volume do CL citado acima (PARKINSON; TURVEY; JENNER, 1994).

Sabe-se que os folículos ovulatórios com maior diâmetro têm maior capacidade de produzir E2 (SÁ FILHO et al., 2010; PERRY et al., 2014), e que o tamanho do folículo é positivamente correlacionado com o tamanho do CL formado, e sua capacidade em produzir P4 (VASCONCELOS et al., 2001; PERES et al., 2009). Em vacas leiteiras de alta produção, os diâmetros do folículo dominante e do CL são maiores, no entanto as concentrações de E2 (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004) e P4 (SARTORI et al., 2004) são menores, em comparação às novilhas. Há duas hipóteses que podem explicar essas observações: a redução na capacidade de produção de esteroides do folículo e do CL em vacas leiteiras de alta produção, ou o maior fluxo sanguíneo hepático, devido a maior ingestão de matéria seca, o que leva à maior metabolização dos hormônios esteroides. Em relação a primeira hipótese (menor capacidade esteroidogênica do CL de vacas em lactação), recentemente foi encontrada uma maior expressão de mRNA para STAR no folículo dominante de novilhas, comparada às vacas em lactação (WALSH et al., 2012), o que poderia sugerir uma maior atividade esteroidogênica em

novilhas, comparada às vacas. Entretanto, alguns estudos são indicativos de que esta produção possa ser similar (BASTOS, 2012). Desta forma, para confirmação desta hipótese estudos adicionais são necessários .

Em relação à maior metabolização hepática de hormônios esteroides, vacas leiteiras de alta produção ingerem grande quantidade de matéria seca, o que promove aumento na circulação sanguínea hepática e favorece a metabolização dos hormônios esteroides (SANGSRITAVONG et al., 2002; WILTBANK et al., 2006), reduzindo as concentrações circulantes de P4 (VASCONCELOS et al., 2003; LOPEZ, 2004) e E2 (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004). Esta menor concentração de E2 pode acarretar em comprometimento da fertilidade, já que este hormônio está envolvido no transporte espermático (HAWK; COOPER, 1975; ORIHUELA; ORTIZ; CROXATTO, 1999) e na expressão de genes importantes para a gestação (BRIDGES et al., 2012). Além disso, em animais com reduzidas concentrações circulantes de E2 é necessário período prolongado de crescimento do folículo dominante para que ele atinja diâmetro pré-ovulatório após luteólise (SARTORI et al., 2004), resultando em um maior período de dominância folicular (BLEACH, 2004; CERRI et al., 2009), pois o folículo precisa produzir E2 suficiente para compensar o que está sendo metabolizado em excesso e induzir o pico ovulatório de GnRH. CERRI et al. (2009) trabalhando com vacas Holandesas em lactação demonstrou maior proporção de embriões degenerados provenientes de ovulações com dominância folicular prolongada. No entanto, folículos que ovularam mais precocemente após o estabelecimento da dominância, produziram maior porcentagem de embriões viáveis.

Há relatos de redução na concentração circulante de P4 quando a dieta foi fornecida *ad libitum* em novilhas (VILLA-GODOY et al., 1990), como também em vacas secas, em que foi observada menor concentração de esteroides com o aumento da ingestão alimentar, comparada ao grupo submetido a menor ingestão (BASTOS, 2012). Entretanto, há relatos em novilhas e vacas em que a concentração de E2 não diferiu quando estas foram submetidas à alta ingestão de matéria seca (1,5M), comparada às alimentadas com 70% da manutenção (SARTORI; BARROS, 2011; SURJUS, 2013).

Em relação ao consumo restrito da dieta, há dados na literatura de aumento na concentração circulante de P4 (MCCANN; HANSEL, 1986;

BASTOS, 2012) em vacas, e de concentração circulante de P4 constante em novilhas (SPITZER et al., 1978). No entanto, em vacas submetidas à dieta abaixo dos níveis de manutenção, sabe-se que a menor concentração de P4 e E2 observada nestes casos, seja possivelmente devido à redução na capacidade esteroidogênica do folículo e CL nestes animais (LEROY et al., 2008). Como resultado da redução da concentração de P4, há aumento na frequência de pulsos de LH (DOMÍNGUEZ, 1995), o que pode levar a luteinização prematura do folículo dominante, explicando as possíveis falhas na ovulação com a restrição da dieta.

4.3.2 Metabolismo de P4

A concentração circulante de P4 é o resultado de sua produção e metabolismo (TAIT; BURSTEIN, 1964; WILTBANK et al., 2012), que ocorre principalmente no fígado (figura 1; SANGSRITAVONG et al., 2002). Como descrito anteriormente, a P4 é produzida principalmente pelo CL nos ovários (NISWENDER, 2002), mas pode também ser produzida nas glândulas adrenais, e em grandes quantidades na placenta de fêmeas prenhes (SCHWARZENBERGER et al., 1997). Após sua produção, a P4 é transportada à tecidos alvos via circulação sanguínea, e sua metabolização além de ocorrer no fígado, pode também ocorrer em tecidos do trato digestivo [(figura 2); (SCHWARZENBERGER et al., 1997).

O efeito da ingestão alimentar na regulação do metabolismo de P4 foi inicialmente observado em estudos com suínos e ovinos (PARR et al., 1993; PRIME; SYMONDS, 1993; MILLER et al., 1999), e posteriormente em bovinos (SANGSRITAVONG et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003). VASCONCELOS et al. (2003) observaram que após a ingestão da dieta as concentrações circulantes de P4 reduziram de forma aguda (até 6 h após a ingestão). Ainda, em mesmo estudo foi demonstrado que a dieta fornecida em múltiplas refeições ao longo do dia elimina este efeito agudo da dieta na concentração circulante de P4. Particularmente em vacas leiteiras foi demonstrado que a taxa de metabolismo de P4 é geralmente determinada pelo fluxo sanguíneo hepático (SANGSRITAVONG et al., 2002). Tal fluxo resulta da circulação de dois principais vasos, a artéria hepática e a veia porta. A veia

porta drena sangue do trato digestivo para o fígado. Desta forma, com o aumento da ingestão de matéria seca, há necessariamente aumento do fluxo sanguíneo no trato digestivo e aumento no fluxo sanguíneo hepático, possivelmente aumentando a taxa de metabolismo de P4 (SANGSRITAVONG et al., 2002; WILTBANK et al., 2006).

Ainda, em vacas leiteiras ovariectomizadas e não lactantes foi observado que a perda de escore de condição corporal (ECC) foi associada com aumento nas concentrações circulantes de P4. Isto foi atribuído a mobilização de gordura corporal e consequente liberação de P4 estocada no tecido adiposo (RODRIGUES et al., 2011).

Nos hepatócitos, a P4 é inativada basicamente por duas reações, que têm sido descritas como reações de fase I e reações de fase II, estas envolvem reações de monooxigenação (hidroxilação) ou redução (figura 3 e 4). Ambas as reações resultam em metabólitos hidrofílicos (figura 3 e 4). Na primeira fase de catabolismo de P4 hepático, existem duas vias em que a P4 pode ser inativada nos hepatócitos, em uma destas vias a P4 é inativada pelas enzimas da família citocromo P450, e a outra via envolve as enzimas 5-alfa e 5 beta redutases [(figura 4); (MURRAY, 1991; MURRAY, 1992; PENNING et al., 2000; YI; IAN; TREVOR, 2011)]. A segunda fase de metabolismo de P4, envolve a conjugação de grupos hidrofílicos (glucoronídeos ou sulfato) com a molécula de P4, nesta fase estão envolvidas as enzimas uridina difosfato glucuronosiltransferase (UGT1A e UGT1B; figura 3). Esta etapa inativa a P4 e facilita sua excreção na urina e fezes (SANGSRITAVONG et al., 2002)

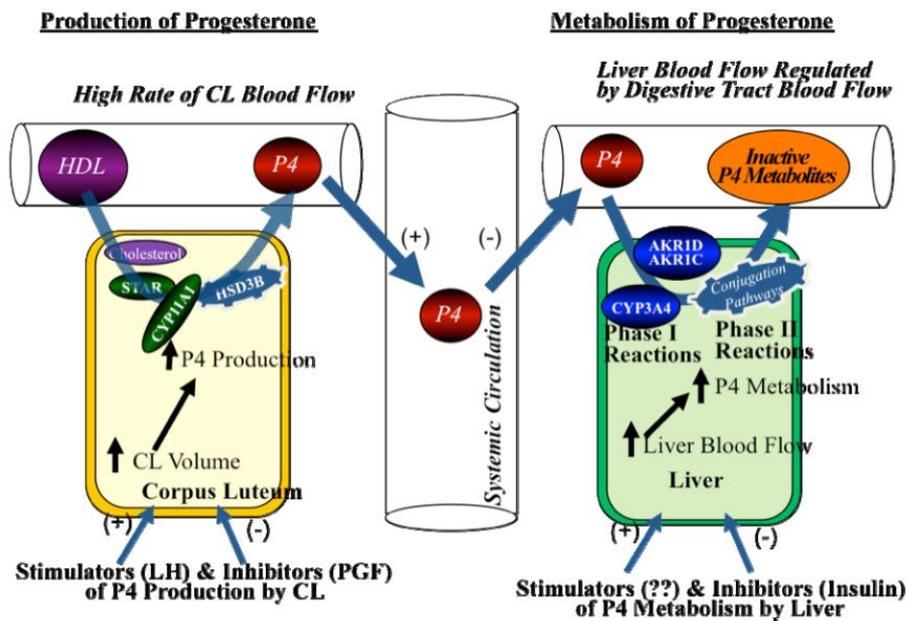
Os metabólitos livres de P4 ou conjugados podem ser filtrados nos rins e eliminados na urina, como também ser secretados no ducto biliar e então liberados no intestino. No intestino, os esteroides conjugados podem ser desconjugados por glucoronidases ou sulfatases, e assim reabsorvidos do lúmen intestinal e transportados de volta para o fígado via circulação entero-hepática (figura 2); (TAYLOR, 1970; ADLERCREUTZ; MARTIN, 1980; SCHWARZENBERGER et al., 1997). Entretanto, alguns destes esteroides não são reabsorvidos do intestino, e são eliminados nas fezes. Além disso, ambos – esteroides livres e seus metabólitos podem também estar presentes no leite e saliva (figura 2).

Os principais metabólitos descritos na literatura resultantes do catabolismo de P4 são a 21-hidroxiprogesterona e 6 β -hidroxiprogesterona que são resultado da inativação da P4 pelas enzimas CYP2C e CYP3A, respectivamente (MURRAY, 1991; MURRAY, 1992). No entanto, estes estudos foram realizados *in vitro*; e os produtos geralmente encontrados no metabolismo *in vivo* são diferentes dos produtos encontrados *in vitro*. A maioria dos metabólitos encontrados no sangue, urina e fezes são 5-alfa ou 5-beta pregnanes reduzidas, indicando que os caminhos envolvidos com as enzimas redutases (AKR1C e AKR1D) representam os principais caminhos do metabolismo de P4 *in vivo* (STUPNICKI; WILLIAMS, 1968; CHANTILIS et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1997), sendo a enzima AKR1C4 a mais abundante com alta eficiência catalítica, revisado por (WILTBANK et al., 2012). No entanto, há poucos estudos *in vivo* a respeito da regulação de enzimas que catabolizam P4 em bovinos. Além disso, a maioria destes estudos envolve apenas fêmeas *Bos taurus* (LEMLEY et al., 2008; LEMLEY et al., 2010b; LEMLEY et al., 2010a; VIEIRA et al., 2012; MCCRACKEN et al., 2015; VOELZ et al., 2015).

Em relação às possíveis influências do estado nutricional e metabólico do animal na ação destas enzimas catabolizando P4, a insulina parece inibir a expressão gênica das duas principais enzimas da família citocromo P450, a CYP3A e CYP2C em microsomas hepáticos de bovinos e ovinos (SMITH et al., 2006; LEMLEY et al., 2008; LEMLEY et al., 2010b; LEMLEY et al., 2010a). Neste contexto, VIEIRA et al. (2010) trabalharam com vacas não lactantes (Gir x Holandesas) em adequado estado nutricional, ovariectomizadas e suplementadas com P4 exógena, que receberam infusão de glicose para aumentar as concentrações circulantes de insulina. Foi observado aumento nas concentrações plasmáticas de P4 nas vacas que receberam infusão de glicose comparada ao grupo controle. Este resultado foi atribuído à redução no catabolismo hepático de P4 (VIEIRA et al., 2010). Da mesma forma, em outro estudo foi observado que maiores concentrações circulantes de insulina podem atrasar o *clearance* hepático de P4 em vacas ovariectomizadas com dispositivo intravaginal de P4 (MORIEL et al., 2008). Em contrapartida, recentemente foi observado que a adição de ingredientes propiogênicos à dieta como estratégia

para aumentar as concentrações de insulina falhou em aumentar as concentrações circulantes de P4 (LEIVA et al., 2013).

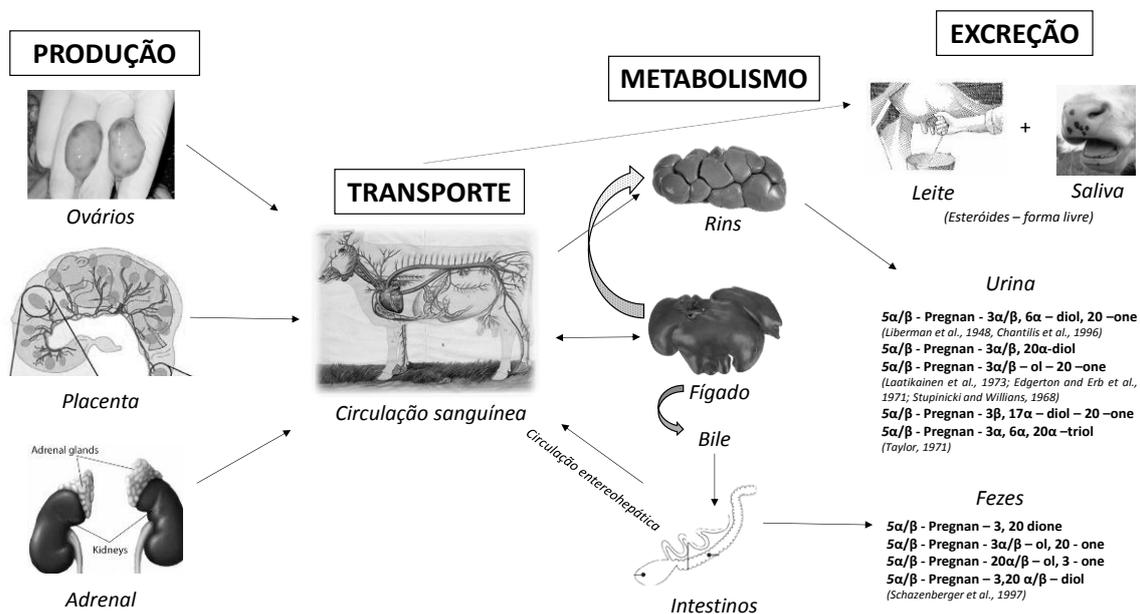
Figura 1. Modelo fisiológico dos fatores que regulam a concentração de progesterona (P4) em vacas leiteiras lactantes.



Fonte: (WILTBANK et al., 2012)

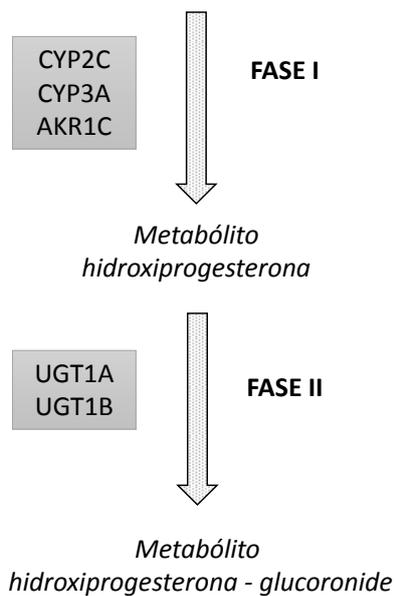
Legenda: O modelo descrito à esquerda na figura demonstra a produção de progesterona (P4) pelo corpo lúteo (CL) através de caminhos que convertem o colesterol de lipoproteínas de alta densidade (HDL) em P4. O transporte de colesterol pela StAR, e as duas enzimas esteroideogênicas, CYP11A1 e HSD3 β são críticos para esta conversão. Além disso, é enfatizado no modelo que o fator determinante para uma maior produção de P4 é um CL de maior volume. O modelo descrito à direita demonstra o metabolismo de P4 no fígado, no qual estão envolvidas reações de fase I, que são reações de hidroxilação (monooxigenação) realizadas pelas enzimas da família citocromo P450 (CYP3A4), e as 5 α e 5 β redutases (AKR1C e AKR1D). Nas reações de fase II estão envolvidas reações de conjugação com glucoronídeos. Este modelo também enfatiza o aumento do fluxo sanguíneo hepático como importante promotor do aumento das taxas de metabolismo de P4.

Figura 2. Órgãos envolvidos na produção, metabolismo, e excreção de progesterona (P4); e metabólitos encontrados na urina e fezes. Os metabólitos encontrados nas fezes estão na forma livre, enquanto que os metabólitos encontrados na urina são geralmente conjugados com glucoronídeos e alguns sulfatos.



Fonte: Adaptado de (SANGSRITAVONG, 2002)

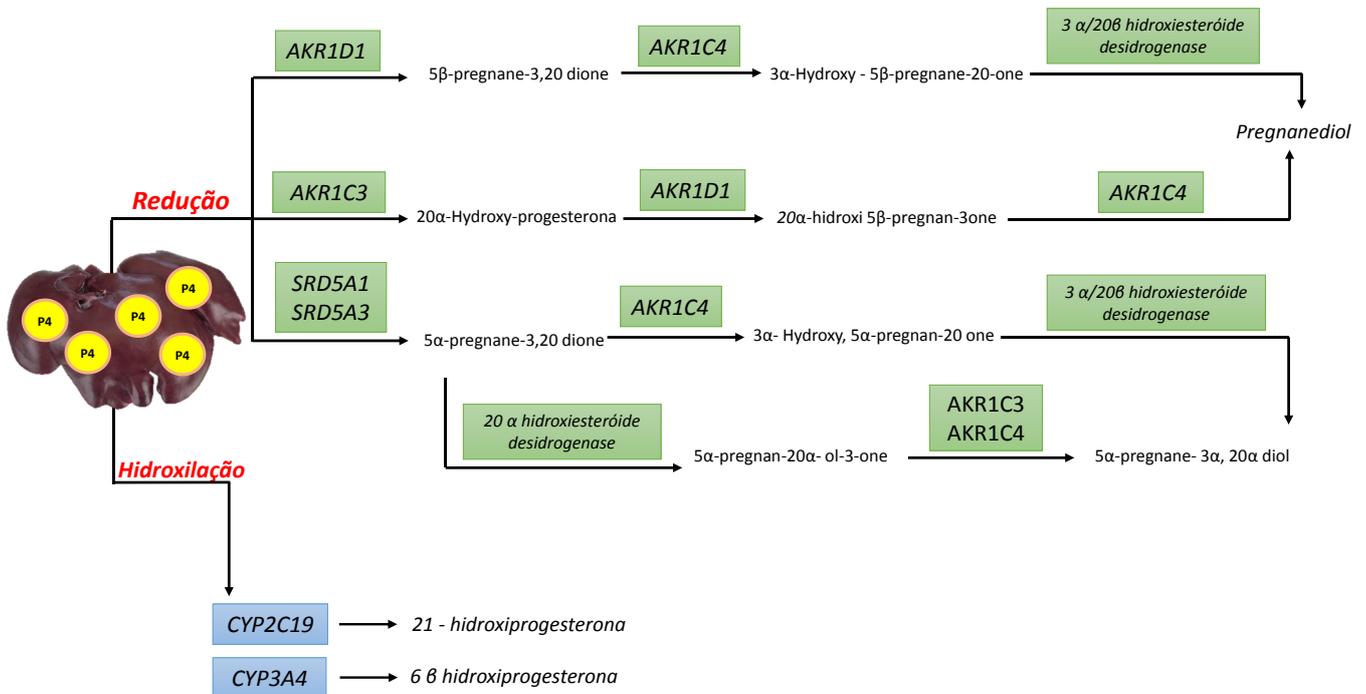
Figura 3. Biotransformação de progesterona (P4) nos hepatócitos



Fonte: (LEMLEY et al., 2010a)

Legenda: Durante a primeira fase de catabolismo de progesterona (P4), as enzimas envolvidas são citocromo P450 2C (CY2C), P450 3A (CYP3A) e aldo keto reductase (AKR1C), e na segunda fase as enzimas uridina difosfato glucuronosiltransferase (UGT1A e UGT1B). Na primeira fase, os metabólitos formados são as hidroxiprogesteronas. Na segunda fase, as UGTs conjugam o metabólito hidroxiprogesterona com o ácido glucurônico.

Figura 4. Modelo hipotético gráfico das vias envolvidas na primeira fase de biotransformação de progesterona (P4) nos hepatócitos. Em uma das vias, a P4 é inativada pelas enzimas citocromo P450 2C (CYP2C) e citocromo P450 3A (CYP3A), e a outra via envolve as enzimas 5 – alfa (AKR1C4, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A3) e 5 beta redutases (AKR1D1). Ambas as vias envolvem a formação de metabólitos hidrofílicos.



Fonte: Adaptado de Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: Steroid Hormone Biosynthesis. Disponível em: <http://www.kegg.jp>. Acesso em: 31 ago.2015.

4.3.3 Gonadotrofinas

O estado nutricional do animal pode ter influência direta na liberação de gonadotrofinas pela hipófise (WEBB et al., 2004). A glicose e a insulina são importantes sinalizadores do estado nutricional, e podem exercer ações diretas na dinâmica folicular e na liberação de LH e FSH. Por exemplo, a glicose atua no sistema nervoso central como principal fonte de energia, modulando a síntese e liberação de gonadotrofinas (DISKIN et al., 2003). Ainda, o aumento na população folicular pode estar associado a maior concentração plasmática de IGF-1 e insulina (FRERET et al., 2006).

Vacas *Bos indicus* submetidas à longo período de restrição alimentar, têm comprometimento na síntese e liberação de LH, e desta forma permanecem em anestro (RHODES et al., 1995). Da mesma forma, vacas lactantes e animais submetidos à baixo plano nutricional tem menor frequência de pulsos de LH que animais não lactantes ou submetidos a adequado plano nutricional (RHODES; ENTWISTLE; KINDER, 1996; BOSSIS et al., 1999; MACKEY et al., 2000; WOLFENSON et al., 2004).

4.4. SIMILARIDADES E DIFERENÇAS NA FISIOLOGIA REPRODUTIVA EM *BOS TAURUS* E *BOS INDICUS*

4.4.1 COMPORTAMENTO ESTRAL

O comportamento de estro ocorre quando há queda nas concentrações circulantes de P4 e aumento nas concentrações de E2 (ALLRICH, 1994). Em fêmeas bovinas, este comportamento pode ser influenciado pela idade (DE SILVA et al., 1981), raça (RAE et al., 1999) e produção de leite (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004). Além disso, a quantidade de ingestão de matéria seca, peso corporal, metabolismo de esteroides (SARTORI et al., 2010) e estresse, discutido por (MAZIERO et al., 2011), também podem exercer influência sobre o comportamento estral.

Fêmeas zebuínas apresentam estro em média por 10 h, duração mais curta (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003) comparado à fêmeas taurinas (MIZUTA, 2003). Particularmente em vacas leiteiras de alta produção, a

duração do comportamento de estro também pode estar reduzida (NEBEL; JOBST; DRANSFIELD, 1997) devido ao alto metabolismo de E2 nesta categoria (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004). Ainda, há relatos de redução no comprimento e intensidade do estro em vacas Holandesas com estresse térmico (NEBEL; JOBST; DRANSFIELD, 1997; LUCY, 2001).

Outros estudos têm demonstrado que fêmeas cruzadas *Bos indicus* x *Bos taurus* e *Bos taurus* apresentam duração de estro similar, revisado por (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003; SARTORI; BARROS, 2011). Da mesma forma, BASTOS (2012) demonstrou que em condições climáticas e nutricionais similares, vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* manifestam estro com mesma intensidade e duração.

Em relação ao efeito do fornecimento de dieta no comportamento estral, vacas submetidas à restrição alimentar (0,7M) mostraram ter estro de maior duração ($17,1 \pm 2,5$ vs. $10,7 \pm 2,2$ h) e intensidade ($29,8 \pm 5,1$ vs. $8,9 \pm 1,9$ montas) comparadas às novilhas alimentadas *ad libitum* (MOLLO et al., 2007). Isto possivelmente devido ao menor metabolismo de esteroides nestes animais comparado aos submetidos à dieta *ad libitum*.

Por fim, outro ponto que deve ser discutido, e que pode afetar o comportamento estral de fêmeas bovinas é o estresse, discutido por MAZIERO et al. (2011). A administração de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) foi capaz de inibir o comportamento de estro devido a diminuição na secreção de E2. Com isso, o pico de LH foi atrasado e a ovulação ocorreu mais tardiamente (DAVIDGE et al., 1987). No entanto, em outro estudo a indução do estresse causado por transporte dos animais não alterou os sinais de estro. Deve-se levar em consideração tipo de manejo e duração do período à que estes animais são submetidos ao estresse (MAZIERO et al., 2011).

4.4.2 IDADE À PUBERDADE

Em fêmeas bovinas, a idade à puberdade é definida quando ocorre a primeira ovulação e subsequente fase luteínica (MORAN; QUIRKE; ROCHE, 1989). Sabe-se que para que ocorra a puberdade é necessária a redução da retroalimentação negativa do E2 sobre o hipotálamo. Essa diminuição foi observada mais cedo em novilhas *Bos taurus*, comparada às *Bos indicus*

(RODRIGUES; KINDER; FITZPATRICK, 2002). A nutrição está intimamente relacionada a este aparecimento tardio da puberdade nos rebanhos zebuínos nacionais, ocasionada muitas vezes pelo manejo deficiente de pastagens (FAJERSSON et al., 1991). No entanto, independente da nutrição parece que há um fator genético associado com a puberdade em fêmeas zebuínas (NOGUEIRA, 2004).

4.4.3 NÚMERO DE ONDAS FOLICULARES E POPULAÇÃO FOLICULAR

O intervalo interovulatório médio para fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* é de 21 dias, discutido por (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003). No entanto, há relatos em vacas Holandesas lactantes de alta produção que apresentaram intervalo interovulatório mais longo (23 dias), devido a um maior tempo entre luteólise e ovulação, discutido por (SARTORI et al., 2004). Da mesma forma, há relato em vacas secas *Bos indicus* e *Bos taurus* submetidas a manejo similar apresentando intervalo interovulatório de 23 dias (BASTOS, 2012).

Considerando o número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral, fêmeas da raça Holandesa apresentam de duas a quatro ondas de crescimento folicular (SAVIO et al., 1988; SIROIS; FORTUNE, 1988; GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; WOLFENSON et al., 2004; BASTOS, 2012), com a predominância de duas ondas, e raramente quatro ondas (SIROIS; FORTUNE, 1988; SARTORI et al., 2004). Em fêmeas *Bos indicus*, há relatos de duas a três ondas, com vacas apresentando em sua maioria duas, e novilhas três (FIGUEIREDO et al., 1997). No entanto, há também dados na literatura de predominância de três ondas em vacas (BASTOS, 2012), sendo relatada ainda a presença de até 5 ondas por ciclo estral (GAMBINI et al., 1998; VIANA et al., 2000). Entre os fatores que podem influenciar o número de ondas estão a dieta e a duração da fase luteínica (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989). Em relação à influência da dieta no número de ondas foliculares, foi observada predominância de três ondas em novilhas com 70% de dieta de manutenção, e duas ondas em animais com 180% da mesma dieta (MURPHY et al., 1991).

Em cada onda folicular, folículos antrais de 3 a 4 mm são recrutados e iniciam uma fase de crescimento comum por cerca de três dias (GINTHER et

al., 2003). Em bovinos, a população folicular ovariana está aproximadamente em torno de 235.000 folículos, podendo variar de 0 a 720.000 folículos por ovário (BETTERIDGE et al., 1989). A alta variação entre os indivíduos, e a alta repetibilidade no número de folículos ovarianos em um mesmo indivíduo parecem ser características constantes (IRELAND et al., 2008). Fatores como genética (ERICKSON, 1966a; SMITH et al., 1994), espécie, raça (CAHILL; MARIANA; MAULÉON, 1979), idade, níveis hormonais (ROY; TREACY, 1993) e estado reprodutivo do animal (ERICKSON; REYNOLDS; MURPHREE, 1976) podem influenciar a população dos folículos ovarianos.

A população folicular ovariana é constituída por folículos antrais e pré-antrais. O número de folículos pré-antrais tem importante representatividade da reserva ovariana, porque constitui ao redor de 90% de todos os folículos ovarianos (SILVA-SANTOS et al., 2011). No entanto, embora esta reserva ovariana possa ser altamente variável (ERICKSON, 1966a; b), foi demonstrado média de folículos pré-antrais similar entre fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* (SILVA-SANTOS et al., 2011). Os autores discutem que se fêmeas *Bos indicus* não possuem maior número de folículos pré-antrais que *Bos taurus*, e, no entanto apresentam maior número de folículos antrais na emergência da onda folicular, talvez fêmeas zebuínas tenham menor taxa de atresia folicular que taurinas (SILVA-SANTOS et al., 2011). No entanto, mais estudos são necessários para apoiar esta hipótese.

Sabe-se que fêmeas *Bos indicus* apresentam maior número de folículos antrais que fêmeas *Bos taurus*. BASTOS et al. (2010) observaram que vacas secas *Bos indicus* alimentadas com dieta de manutenção apresentaram maior número de folículos que vacas *Bos taurus* ($42,7 \pm 5,9$ vs. $19,7 \pm 3,2$; $P < 0,05$). Em outro estudo utilizando novilhas como grupo experimental, foi observado que novilhas *Bos indicus* apresentam maior número de folículos no momento da emergência da onda folicular, que novilhas *Bos taurus* ($33,0 \pm 3,2$ vs. $25,4 \pm 2,5$, $P < 0,05$), sendo que as cruzadas (*Bos indicus* x *Bos taurus*) não diferiram dos outros grupos genéticos ($29,6 \pm 2,5$; $P > 0,05$; CARVALHO et al., 2008). Uma série de outros estudos também relata que a população de folículos antrais em novilhas *Bos indicus* é em média maior que em novilhas *Bos taurus* (ALVAREZ et al., 2000; BURATINI et al., 2000; GIMENES et al., 2009).

Acredita-se que maiores concentrações de insulina e IGF-1 são responsáveis pelo maior número de folículos recrutados em zebuínos, que taurinos. Corroborando esta hipótese, foi observada que as concentrações pré-prandiais de insulina foram mais elevadas na fase que ocorre o recrutamento folicular (fase estrogênica), que progesterônica em fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*. Além disso, as concentrações de insulina foram maiores para as fêmeas zebuínas, que taurinas (BASTOS, 2012).

4.4.4 DIVERGÊNCIA FOLICULAR

A divergência folicular é definida como a diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos, sendo caracterizada pela continuidade no desenvolvimento do maior folículo, e declínio ou parada no desenvolvimento dos outros (GINTHER et al., 1996). Em fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* a divergência folicular ocorre cerca de dois dias e meio à três dias após a emergência folicular ou ovulação (GINTHER et al., 1996; SARTORELLI et al., 2005; GIMENES et al., 2008b; BASTOS, 2012). No entanto os diâmetros alcançados pelo folículo dominante e pelo maior folículo subordinado são diferentes de acordo com o grupo genético.

Os tamanhos foliculares médios do folículo dominante e do folículo subordinado na divergência folicular parecem ser maiores em fêmeas *Bos taurus* (Folículo dominante = 8,5 mm e folículo subordinado = 7,2 mm; GINTHER et al., 1996), do que em *Bos indicus* (Folículo dominante = 5,4 a 6,2 mm e folículo subordinado = 5,4 a 5,8 mm; SARTORELLI et al., 2005; GIMENES et al., 2008b).

Sabe-se que a divergência folicular envolve a redução nos níveis de FSH, aumento das concentrações circulantes de E2 e de IGF-1, e aumento na expressão de receptores de LH, discutido por (SARTORI et al., 2001). No entanto, os mecanismos moleculares que envolvem a divergência folicular não estão completamente entendidos. Embora esteja claro que a expressão de receptores de LH ocorra nas células da granulosa de folículos dominantes (XU et al., 1995; BAO et al., 1997), células da teca também expressam receptores de LH em folículos antrais e pré-ovulatórios (XU et al., 1995), e esta expressão é necessária para dar suporte ao crescimento do folículo dominante no

momento da divergência. Entretanto, o exato momento em que estas células começam a expressar estes receptores precisa ainda ser elucidado (EVANS; FORTUNE, 1997; BEG et al., 2001; FORTUNE et al., 2001).

Ainda, sobre os mecanismos moleculares envolvendo a divergência folicular, Walsh et al., 2012 realizaram experimento para determinar os efeitos do ambiente metabólico na expressão diferencial de genes nas células da teca e da granulosa em três estágios distintos do desenvolvimento folicular em vacas leiteiras lactantes e novilhas nulíparas. Utilizando um IPA *software* (Ingenuity® Pathway Analysis, <http://www.ingenuity.com>), os autores identificaram nas células da teca em ambas as categorias, 12 genes relacionados aos caminhos envolvendo a biossíntese de esteroides (*NQO1*, *HMGCR*, *MVK*, *PMVK*, *MVD*, *IDII*, *FNTB*, *FDFT1*, *SQLE*, *LSS*, *DHCR7*, *EBP*) diferencialmente expressos (DEGS), que aumentam sua expressão do período de seleção do folículo dominante até o momento antes do pico de LH. Já nas células da granulosa, sete genes (*DHCR7*, *EBP*, *FDFT1*, *FDPS*, *HMGCR*, *PMVK*, *SQLE*) foram identificados aumentando sua expressão durante o mesmo período; e somente um (*GGPS1*) teve sua expressão reduzida. Além disso, neste mesmo estudo foi observado que o *status* metabólico do animal pode alterar a expressão de genes nas células da granulosa e da teca em vacas leiteiras e novilhas dentro de cada estágio de desenvolvimento folicular. Cinco genes que codificam enzimas envolvidas com a biossíntese de colesterol tiveram maior expressão nas células da teca em vacas leiteiras lactantes, que novilhas (WALSH et al., 2012).

4.4.5 AQUISIÇÃO DA CAPACIDADE OVULATÓRIA

Quando o folículo atinge a divergência folicular, ele ainda não é capaz de responder a um indutor de ovulação. A capacidade ovulatória somente é adquirida quando o folículo dominante alcança maior diâmetro comparado ao que ele possui no momento da divergência folicular. O tamanho que o folículo atinge tal capacidade difere entre fêmeas *Bos taurus* e fêmeas *Bos indicus*. O folículo em fêmeas *Bos indicus* parece adquirir capacidade ovulatória em diâmetro menor que *Bos taurus*. Vacas Holandesas ovularam com a administração de 40 mg de pLH, somente quando o folículo foi maior ou igual à

10 mm de diâmetro (SARTORI et al., 2001). No entanto, em novilhas zebuínas, a administração do mesmo indutor de ovulação levou à ovulação de 33,3%, 80,0% e 90% dos animais com folículos de 7,0 a 8,4; 8,5 a 10 e maior que 10 mm de diâmetro, respectivamente (GIMENES et al., 2008b). Além do aumento do diâmetro folicular, a aquisição da capacidade ovulatória parece estar relacionada a aumento na expressão de receptores de LH nas células da granulosa (SIMÕES et al., 2012).

4.4.6 DIÂMETRO MÁXIMO DO FOLÍCULO DOMINANTE, FOLÍCULO OVULATÓRIO E CORPO LÚTEO

Sabe-se que o tamanho do folículo ovulatório apresenta alta correlação com o tamanho do CL que será formado posteriormente (VASCONCELOS et al., 2001; SARTORI; ROSA; WILTBANK, 2002). Os diâmetros médios máximos alcançados para folículos ovulatórios em fêmeas *Bos taurus* variam entre 12,9 a 17,1 mm (GINTHER; KNOFF; KASTELIC, 1989; BASTOS et al., 2010; SALES, 2011); e em fêmeas *Bos indicus* de 9,4 mm a 12,1 mm (FIGUEIREDO et al., 1997; SARTORELLI et al., 2005; BASTOS et al., 2010; SALES, 2011). O diâmetro do CL também é menor para fêmeas *Bos indicus* [(17 a 21 mm de diâmetro); (RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; FIGUEIREDO et al., 1997)], do que em fêmeas *Bos taurus* [(20 a 30 mm de diâmetro); (GINTHER; KNOFF; KASTELIC, 1989; KASTELIC; BERGFELT; GINTHER, 1990)]. Assim como o volume luteínico (BASTOS et al., 2010).

4.4.7 HORMÔNIOS ESTERÓIDES, GONADOTROFINAS E O ENVOLVIMENTO DO EIXO SOMATOTRÓFICO

4.4.7.1 Estradiol e Progesterona

Dados da literatura são indicativos de que fêmeas taurinas têm maior capacidade esteroideogênica que fêmeas zebuínas (RANDEL, 1976; SEGERSON et al., 1984). Entretanto, trabalhos recentes demonstram que fêmeas zebuínas têm apresentado maior concentração circulante de esteroides, quando comparada às fêmeas taurinas (CARVALHO et al., 2008;

BASTOS et al., 2010). Embora fêmeas taurinas apresentem estruturas ovarianas de maior diâmetro que fêmeas zebuínas, há indícios de que fêmeas *Bos indicus* tenham uma menor metabolização de hormônios esteroides, comparada às fêmeas *Bos taurus* (CARVALHO et al., 2008; BASTOS et al., 2010).

4.4.7.2 Glicose, Insulina e IGF-1

A insulina e a glicose têm papel importante no metabolismo energético celular. A insulina estimula o transporte de glicose para o interior das células por transportadores de membranas específicos (GLUT) presentes na membrana plasmática (LAWRENCE; MCKERN; WARD, 2007). Tem-se observado aumento significativo de insulina em período pré-ovulatório (MCCANN; HANSEL, 1986; ARMSTRONG et al., 2001). Neste contexto, concentrações plasmáticas pré-prandiais de insulina foram mais elevadas na fase estrogênica, que progesterônica tanto em fêmeas *Bos indicus*, quanto em *Bos taurus* (BASTOS et al., 2010). No entanto, foram observadas concentrações plasmáticas pré-prandiais de insulina e IGF-1 maiores em fêmeas zebuínas que taurinas (BASTOS et al., 2010). ALVAREZ et al. (2000) também observaram maiores concentrações circulantes de IGF-1 em fêmeas *Bos indicus* que *Bos taurus*. SALES (2011) observou que doadoras *Bos indicus* apresentaram maiores concentrações de glicose sérica e no fluído folicular, que doadoras *Bos taurus* submetidas a mesmo manejo. Neste mesmo estudo, as concentrações de IGF também foram maiores no fluído folicular em fêmeas *Bos indicus*, que fêmeas *Bos taurus*.

Em outro estudo, embora tenha sido observado maior expressão de mRNA de IGF1 e IGF2, e seus receptores (IGFR1 e IGFR2) em oócitos de vacas *Bos taurus* quando comparados às *Bos indicus*; a expressão de PAPP-A (proteína plasmática associada à prenhez), enzima responsável pela degradação de IGFBPs (proteínas ligantes à IGF), foi maior em vacas *Bos indicus* que vacas *Bos taurus* (SATRAPA et al., 2013). Estes dados são indicativos que possivelmente haja maior biodisponibilidade de IGF em oócitos de fêmeas *Bos indicus*, comparada à fêmeas *Bos taurus*. Ainda, acredita-se que essa diferença nas concentrações de IGF-1, como também de FSH, possa

explicar a maior sensibilidade a tratamentos superovulatórios em doadoras *Bos indicus* (BARROS; NOGUEIRA, 2001).

4.4.7.3 Gonadotrofinas

Em relação às gonadotrofinas, há grande variação nos valores descritos na literatura em relação às diferenças entre raças e períodos do ciclo estral. Foi observada menor onda pré-ovulatória de LH em novilhas *Bos indicus* que novilhas *Bos taurus* ou cruzadas (RANDEL, 1984). Em fêmeas da raça Holandesa, há relatos de valores entre 0,5 ng/mL a 1,5 ng/mL (GINTHER et al., 1999; KULICK et al., 1999; GINTHER, 2000; GINTHER, et al., 2001). Em fêmeas da raça Nelore há relatos entre 0,5 a 1,0 ng/mL após inserção de dispositivo de P4 (CIPRIANO et al., 2011).

Quanto ao FSH, em fêmeas da raça Holandesa, os níveis variam entre 0,2 a 11,5 ng/mL antes da divergência (GINTHER et al., 1996; GINTHER et al., 1997; GINTHER et al., 2001; GINTHER et al., 2002). Após a divergência relata-se queda nas concentrações circulantes deste hormônio para aproximadamente 0,1 a 8,5 ng/mL (GINTHER et al., 1999; KULICK et al., 1999; GINTHER, 2000). Em novilhas Nelore foram detectadas concentrações máximas de FSH ao longo da primeira onda que não ultrapassam 0,3 ng/mL. Esse valor foi verificado um dia e meio (CASTILHO, 2003) e sete dias após a ovulação (BURATINI et al., 2000). BASTOS (2012) comparando vacas não lactantes *Bos indicus* e *Bos taurus* durante um protocolo de sincronização da ovulação observou maior pico de FSH em fêmeas taurinas comparada às zebuínas ($1,3 \pm 0,004$ vs. $1,0 \pm 0,04$ ng/mL).

4.4.7.4 Hormônio Anti-Mülleriano (AMH)

O hormônio Anti-Mülleriano (AMH) é membro da família de fatores de crescimento TGF β (CATE et al., 1986). A expressão de AMH é alta nas células da granulosa de folículos antrais pequenos e diminui durante o crescimento final do folículo (VIGIER et al., 1984; TAKAHASHI et al., 1986; VISSER et al., 2007; MONNIAUX et al., 2008; RICO et al., 2009).

Novilhas *Bos indicus* e *Bos taurus* submetidas a mesmo manejo tiveram a concentração de AMH e a população folicular ovariana avaliadas no momento da emergência da onda folicular em 3 períodos com 60 dias de intervalo entre cada período. A concentração de AMH foi maior em novilhas *Bos indicus* comparada às *Bos taurus* (1,0 vs. 0,3 ng/mL, $P < 0,05$), e esta concentração foi correlacionada positivamente com a população folicular em todos os períodos avaliados (BATISTA et al., 2014).

Posteriormente, GUERREIRO et al. (2014) observaram que tanto em fêmeas *Bos taurus*, como em fêmeas *Bos indicus* há uma correlação positiva entre produção de embriões *in vitro* e AMH. Esta informação também se estende para bezerras taurinas e zebuínas (BATISTA et al., 2016).

4.4.8 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)

4.4.8.1 Tratamentos com P4 e E2

Através da inseminação artificial (IA) é possível obter-se melhoramento genético (BÓ; CUTAIA; BROGLIATTI, 2001). Em fêmeas *Bos indicus*, o emprego da IA é dificultado pela detecção de cio, duração de anestro pós-parto e puberdade tardia. Com o uso da IATF estes problemas podem ser contornados. A IATF envolve um controle preciso do crescimento folicular com a indução da emergência de nova onda folicular, controle da duração do crescimento folicular até estágio pré-ovulatório, sincronização da inserção e retirada da fonte de P4 exógena e endógena e indução sincronizada da ovulação (BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007).

Há basicamente dois tipos de protocolos de sincronização da ovulação para a IATF, protocolos baseados no uso de GnRH (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995; SOUZA et al., 2008) e/ou esteroides (BARUSELLI et al., 2012; BÓ; BARUSELLI, 2014). Tratamentos com E2, progestágenos e P4 têm sido utilizados nos últimos anos para sincronização da ovulação tanto em fêmeas *Bos taurus*, como em fêmeas *Bos indicus* (MACMILLAN; PETERSON, 1993; BO et al., 1994; MACMILLAN; BURKE, 1996; BÓ; CUTAIA; BROGLIATTI, 2001). Os protocolos que utilizam E2 e P4 para sincronizar a ovulação consistem basicamente na inserção de um dispositivo de P4 e a

administração de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) no dia 0 (D0; para induzir atresia folicular e sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular). Sete, oito ou nove dias após o início do protocolo (D0), o dispositivo de P4 é removido e uma dose prostaglandina $F_{2\alpha}$ é administrada. Vinte e quatro horas após a remoção do dispositivo é feita a aplicação de BE, ou de GnRH 54 horas após a remoção do dispositivo para sincronizar a ovulação (BÓ; CUTAIA; TRIBULO, 2002; MARTINEZ et al., 2002). Além do uso de BE como indutor de ovulação, também é possível utilizar 0,5 ou 1 mg de cipionato de estradiol no momento da retirada do dispositivo de P4 (COLAZO; KASTELIC; MAPLETOFT, 2003; BÓ; BARUSELLI; MAPLETOFT, 2013). Recentemente, tem sido avaliado um novo protocolo em novilhas de corte *Bos taurus* baseado no uso de E2 aliado a maior duração do proestro (DE LA MATA; BÓ, 2012). Este protocolo, denominado J-Synch, consiste no uso de 2 mg de BE e de dispositivo intravaginal de P4 por 6 dias. Na retirada do dispositivo é realizada a aplicação de uma dose de $PGF_{2\alpha}$ e 72 h após é feita a administração de GnRH e realizada a IATF. Tem sido observada média de P/IA com o uso deste protocolo em novilhas Angus de 53,7% (DE LA MATA; BÓ, 2012) e em novilhas Holandesas de 62,7% (RÉ; DE LA MATA; BÓ, 2014).

A resposta ao uso de E2 e P4 durante protocolo de sincronização da ovulação para IATF tem sido diferentes entre fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*. CARVALHO et al. (2008) observaram que durante um protocolo de sincronização da ovulação com P4 e E2, novilhas *Bos indicus* (Nelore) mantinham maior concentração de P4 que novilhas *Bos taurus* (Holandesa), o que refletiu em falhas na ovulação em fêmeas *Bos indicus*. Possivelmente, esta alta concentração de P4 diminuiu a frequência de pulsos de LH (SANCHEZ et al., 1995; BERGFELD et al., 1996; BURKE; MACMILLAN; BOLAND, 1996; KINDER et al., 1996; FIKE et al., 2004; HATLER et al., 2008), e desta forma suprimiu o crescimento folicular em novilhas *Bos indicus* (CARVALHO et al., 2008).

Como alternativa para redução da concentração de P4 durante o protocolo de sincronização da ovulação, tem sido feito o uso de progestágenos ou o tratamento com $PGF_{2\alpha}$ no início do tratamento com dispositivo de P4 (SÁ FILHO et al., 2005; CARVALHO et al., 2008; DIAS et al., 2009).

Atualmente há progressos significativos em relação à compreensão dos padrões de crescimento folicular durante o uso de biotécnicas da reprodução, como a IATF (BÓ; BARUSELLI; MAPLETOFT, 2013). Neste contexto, o conhecimento da fisiologia da reprodução é essencial para compreensão dos resultados obtidos com o uso das biotécnicas da reprodução, demonstrando que estratégias específicas precisam ser empregadas aos diferentes grupos genéticos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - SP (FMVZ) – USP (protocolo número 2565/2012).

5.1 LOCAL

O projeto foi realizado durante o período de janeiro a maio de 2013. Os animais permaneceram durante todo o período experimental no Laboratório de Produção de Bovinos de Leite (LBPL) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) – *campus* Pirassununga – SP. A cidade de Pirassununga localiza-se à 21°59'46" latitude sul e 47°25'33" longitude oeste, a uma altitude de 627 m. A temperatura ambiental e umidade relativa do ar média durante o período experimental estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Dados climáticos de temperatura e precipitação média da cidade de Pirassununga – SP, janeiro a maio de 2013.

Mês	T°C mínima	T°C máxima	Precipitação (mm)
Janeiro	20°C	27°C	262
Fevereiro	19°C	27°C	204
Março	19°C	27°C	172
Abril	17°C	26°C	79
Maió	14°C	23°C	67

Fonte: INMET/CFS/Interpolação

5.2 ANIMAIS DO EXPERIMENTO

Trinta e duas novilhas foram distribuídas de forma equilibrada de acordo com peso corporal em um arranjo fatorial 2 X 2 [(nível de ingestão de matéria seca/energia da dieta – alta e baixa ingestão; e grupo genético – *Bos indicus* (raça Nelore) e *Bos taurus* (raça Holandesa)] em um delineamento *cross-over*. Desta forma, ficaram divididos homogeneamente quatro grupos experimentais:

novilhas *Bos indicus* (raça Nelore; n = 16) e *Bos taurus* (raça Holandesa, n = 16) submetidas à alta ingestão de matéria seca/energia (figura 5); e novilhas *Bos indicus* (raça Nelore; n = 16) e *Bos taurus* (raça Holandesa, n = 16) submetidas à baixa ingestão de matéria seca/energia (figura 6).

No início do experimento, as novilhas da raça Nelore ($24 \pm 0,4$ meses de idade) do grupo alta e baixa ingestão de matéria seca/energia apresentavam respectivamente peso médio de $464,4 \pm 9,7$ kg e $463,3 \pm 9,8$ kg; e escore de condição corporal (ECC) $3,0 \pm 0,09$ e $3,1 \pm 0,08$ [utilizando-se a escala de 1 (muito magra) a 5 (muito gorda)]. As novilhas da raça Holandesa ($18,0 \pm 0,5$ meses de idade) do grupo alta e baixa ingestão de matéria seca/energia apresentavam respectivamente peso médio de $369,1 \pm 15,8$ kg e $379,2 \pm 14,8$ kg; e ECC de $2,9 \pm 0,06$ e $3,0 \pm 0,05$ [utilizando-se a escala de 1 (muito magra) a 5 (muito gorda); segundo (WILDMAN et al., 1982)]. Durante todo período experimental foram realizadas pesagens das novilhas a cada 15 dias para possível ajuste da dieta, quando necessário.

5.3 DIETA EXPERIMENTAL

As novilhas foram distribuídas para receber dieta experimental única, formulada conforme as recomendações do NRC (2001) em dois protocolos de fornecimento de dietas:

1) Alto consumo de ingestão de matéria seca/energia: Dieta experimental fornecida *ad libitum*, com consumo esperado de 2,2 e 2,5% do peso vivo dos animais, e ganho de peso estimado em 900g/dia.

2) Baixo consumo de matéria seca/energia: Dieta experimental fornecida com restrição alimentar, ajustada para consumo de 1% do peso vivo dos animais, e ganho de peso de 200 – 300 g/dia.

As dietas experimentais foram baseadas em silagem de milho como volumoso, e foram utilizados como componentes do concentrado fubá de milho, farelo de soja, grão de soja cru e integral, ureia, sulfato de amônio e *premix* mineral e vitamínico. A relação volumoso e concentrado utilizada foi de 65:35.

A dieta foi fornecida diariamente em uma única refeição (8:00 a.m.) para os quatro grupos experimentais (*Bos indicus* – alta e baixa ingestão de matéria seca/energia, e *Bos taurus* – alta e baixa ingestão de matéria seca/energia), que permaneceram alojados separadamente (8 animais por piquete); em quatro piquetes iguais em medida (505, 99 m²), área de sombreamento (figura 8), área de cocho (figura 9) e acesso livre à água. Este sistema de fornecimento da dieta permitia avaliar o consumo de cada grupo experimental, a partir da pesagem da dieta total fornecida antes de cada refeição, bem como a sobra remanescente em cada comedouro 24 h após o fornecimento de cada refeição. Assim foi possível mensurar o consumo de matéria seca e ajustar as sobras remanescentes nas dietas de alto consumo, para que essas fossem entre 5 a 10% do oferecido.

Foi realizada rotação das novilhas nos quatro piquetes disponíveis ao final da primeira réplica, sendo que o experimento foi realizado em duas réplicas. Anteriormente ao início de cada réplica, ao qual denominamos de **período pré-experimental**, todas as novilhas foram submetidas a um período de 15 dias de adaptação à dieta. Particularmente durante este período, a dieta foi fornecida *ad libitum* para todas as novilhas do experimento. Além disso, foram realizadas duas avaliações ultrassonográficas em intervalo de 12 dias para assegurar que todas as novilhas estivessem cíclicas (presença de CL; figura 10). Desta forma, as novilhas também foram submetidas neste período à adaptação ao curral de manejo que seria utilizado durante o período experimental.

Posteriormente, todas as novilhas foram submetidas a um período que denominamos como **período experimental**, que foi subdividido em duas fases. Na primeira fase, pré-protocolo hormonal, todas as novilhas receberam a dieta durante 15 dias conforme o grupo experimental (alta ou baixa ingestão de matéria seca/energia). Na segunda fase, que se refere ao início do protocolo hormonal, todas as novilhas receberam a dieta conforme grupo experimental (alta ou baixa ingestão de matéria seca) por um período de 17 dias, iniciando

no primeiro dia do protocolo (D0) até 9 dias após o final do mesmo (D17; figura 10).

Ao final da segunda réplica, todas as novilhas receberam dois dias adicionais de dieta, ainda conforme o grupo experimental. Isto para que as novilhas ainda estivessem recebendo a dieta experimental até o dia da biópsia hepática (figura 10, detalhes sobre a biópsia hepática estão descritos no item “7.Biopsia hepática”).

Figura 5. Novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*; $24 \pm 0,4$ meses de idade) e da raça Holandesa (*Bos taurus*; $18,0 \pm 0,5$ meses de idade) que foram submetidas à alta ingestão de matéria seca durante período experimental.



Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

Figura 6. Novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*, $24 \pm 0,4$ meses de idade) e da raça Holandesa (*Bos taurus*; $18,0 \pm 0,5$ meses de idade) que foram submetidas à baixa ingestão de matéria seca durante período experimental



Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

Figura 7. Piquetes em que as novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*, $24 \pm 0,4$ meses de idade) e Holandesa (*Bos taurus*, $18,0 \pm 0,5$ meses de idade) permaneceram alojadas durante todo o período experimental.



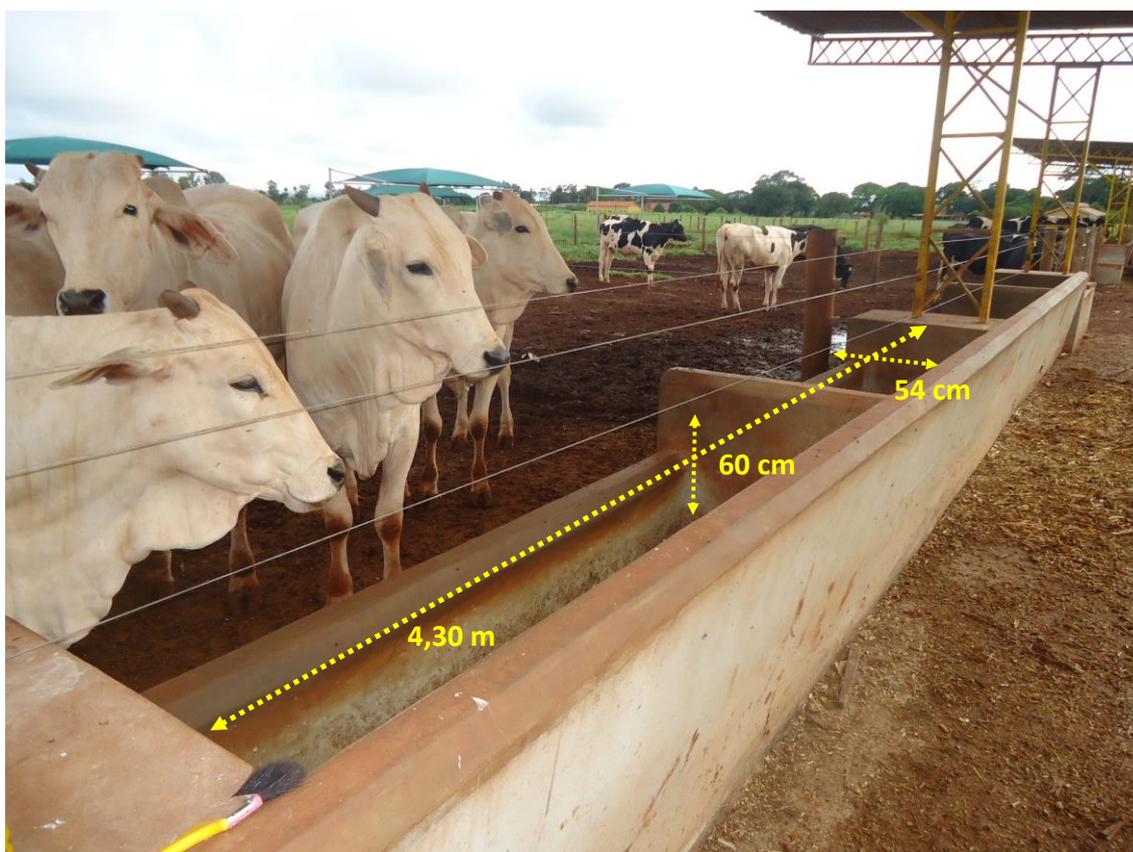
Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

Figura 8. Área de sombreamento igualmente acessível nos piquetes em que as novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*, $24 \pm 0,4$ meses de idade) e Holandesa (*Bos taurus*, $18,0 \pm 0,5$ meses de idade) permaneceram alojadas durante todo o período experimental



Fonte: Batista, E.O.S. (2015).

Figura 9. Área de cocho igualmente disponível nos piquetes em que as novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*, $24 \pm 0,4$ meses de idade) e Holandesa (*Bos taurus*, $18,0 \pm 0,5$ meses de idade) permaneceram alojadas durante todo o período experimental



Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

5.4 SINCRONIZAÇÃO DA EMERGÊNCIA DA ONDA FOLICULAR

No primeiro dia do protocolo hormonal (D0), cada novilha recebeu um dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de P4 (CIDR[®], Zoetis, Brasil) que foi mantido por 8 dias. Neste dia (D0), também foram administrados 2 mg i.m. de BE (SincrodioI[®], OuroFino Saúde Animal, Brasil) e uma dose de PGF₂α (500 µg, i.m., Sincrocio[®], Ourofino Saúde Animal). Após 8 dias, o dispositivo de P4 foi retirado e 24h após foi realizada aplicação de 1 mg de BE (SincrodioI[®], OuroFino Saúde Animal, Brasil; figura 10).

Para que a única fonte de P4 fosse proveniente do dispositivo intravaginal de P4, todas as novilhas receberam duas aplicações sequenciais de PGF₂α (500 µg, i.m., Sincrocio[®], Ourofino Saúde Animal, Brasil) em um intervalo de 12 dias e novamente às 18 h e 12 h antes da inserção do dispositivo (D0; figura 10).

5.5 ULTRASSONOGRAFIA E DINÂMICA FOLICULAR

Para estudo da dinâmica folicular, todas as novilhas foram submetidas à exames ultrassonográficos transretais, realizados pelo mesmo operador. Os exames tiveram início no momento da inserção do implante (D0), e foram realizados a cada 24 h. Após a retirada do implante de P4, os exames foram realizados a cada 12 h para verificar a ovulação dos animais.

O momento da ovulação foi definido pelo desaparecimento do folículo dominante presente no exame anterior, seguido pela formação de um CL na mesma posição. O momento da emergência folicular foi definido retrospectivamente quando o futuro folículo dominante apresentava 4 mm. Neste momento, foi avaliado o número total de folículos presente em cada ovário em todos os grupos experimentais.

O momento do início do estro foi definido com o auxílio de bastão marcador, que consiste na pintura da base da cauda dos animais no dia oito do protocolo hormonal (D8), e assim a marca de bastão é gradativamente retirada, devido a aceitação de monta, indicando que o animal está em estro.

A taxa de crescimento folicular foi definida como a diferença entre o diâmetro mínimo (momento do aparecimento do folículo) e o diâmetro máximo

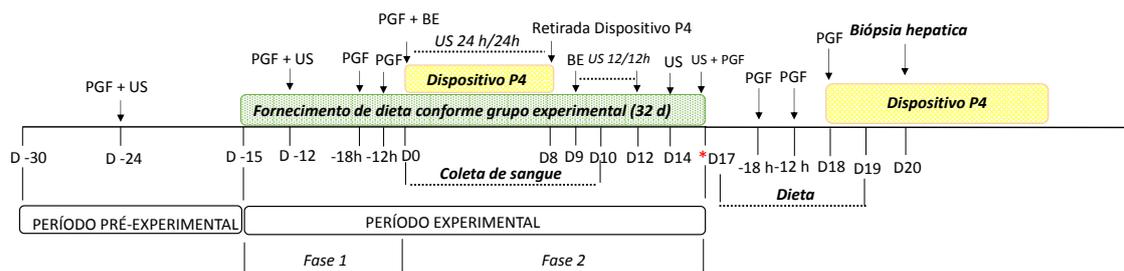
do folículo (D10), dividida pelo período de crescimento como previamente descrito (FIGUEIREDO et al., 1997).

O diâmetro e volume do CL foram avaliados seis (D14) e nove dias (D17) após a retirada do dispositivo intravaginal de P4 (D8; figura 10). Para cálculo do volume do CL foi considerado o volume de sua cavidade (quando esta foi observada). Para tanto, foi utilizado a seguinte fórmula: volume do CL = $[(4/3 * \pi * r^3) - (4/3 * \pi * r (\text{cavidade})^3)]$, sendo que r = diâmetro do CL, ou da cavidade do CL avaliado por exame ultrassonográfico dividido por dois.

5.6 COLETA DE SANGUE E DOSAGEM HORMONAL

Para análise das concentrações circulantes de P4, as amostras de sangue foram colhidas no momento da inserção do dispositivo intravaginal de P4 (D0), a cada 24 h até o dia 10 (D10). Como também, no dia 8 do protocolo hormonal (D8), a cada 3 h até 12 h. As amostras foram colhidas da jugular por venopunção em tubos para coleta de sangue à vácuo K3 EDTA (Labor Import, Brasil). Posteriormente, estes foram centrifugados por 15 min a 3000 rpm [(1700 g); (centrífuga Excelsa II, Mod. 206 BL, Fanem[®], São Paulo - BR)], para separação do plasma. Em seguida, as amostras de plasma foram acondicionadas em microtubos tipo eppendorf[®] previamente identificados e foram conservados em freezer a -20°C.

Figura 10. Delineamento experimental



Legenda: Delineamento experimental realizado em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) submetidas à alta (n = 16) e baixa ingestão de matéria seca/energia (n = 16); e da raça Holandesa (*Bos taurus*), submetidas à alta (n = 16) e baixa ingestão de matéria seca/energia (n = 16). Ao final da segunda réplica (*D17) foram fornecidos dois dias adicionais de dieta experimental (D18 e D19) para que as novilhas ainda estivessem recendo a dieta conforme grupo experimental até o dia da biópsia hepática (D20). A biópsia hepática foi realizada em período pré-prandial em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) submetidas à alta (n = 7) e baixa ingestão de matéria seca/energia (n = 7); e novilhas Holandesas (*Bos taurus*) submetidas à alta (n = 7) e baixa ingestão de matéria seca/energia (n = 6).

Fonte: Batista. E.O.S., 2015.

6. RADIOIMUNOENSAIO

A dosagem de P4 foi realizada pela técnica de radioimunoensaio (RIA). Para tanto foram utilizados *kits* comerciais (COAT-A-COUNT, Simens[®]). Esta técnica consiste em uma reação imunológica com antígeno (hormônio) e anticorpo, onde o hormônio marcado com isótopo radioativo (ag*) e o hormônio da amostra (ag) competem pelo anticorpo específico em igualdade de condições.

A sensibilidade do ensaio foi de 0,01 ng/mL e o coeficiente de variação inter e intra-ensaio para controle baixo foi respectivamente 3,21% e 2,17%; e para controle alto foi respectivamente 1,42% e 4,77%.

7. BIÓPSIA HEPÁTICA

A biópsia hepática foi realizada no 11° espaço intercostal direito ao redor de 15 centímetros (cm) abaixo das vértebras. Anteriormente ao procedimento de biópsia foi realizada tricotomia, degermação (escovação da pele na região da biópsia com água e sabão) e assepsia desta região (realizada com álcool etílico 70% e solução de 10% de iodopovidona). Posteriormente, todas as novilhas receberam uma anestesia local com cloridrato de lidocaína 2,0% (Xylestesin[®], Cristália Produtos Químicos Ltda., Brasil). Procedeu-se então uma pequena incisão de 1 a 2 cm até o aparecimento da região subcutânea para a inserção da agulha de biópsia. O material utilizado para a biópsia foi o instrumento automático Pro-Mag[™] Ultra e agulhas 16 g x 25 cm Pro-Mag[™] Ultra e I 2.5 (Ecomed, Brasil, figura 11).

Logo após a biópsia, a porção de tecido hepático colhida de cada novilha foi armazenada em criotubos com 1 mL de RNAlater[®] *Stabilization Solution* (ThermoFisher Scientific Inc., USA). Posteriormente, estes criotubos contendo porção de tecido hepático embebida em 1 mL de RNAlater[®] foram armazenados por um período de 12 h, à 4°C. Após este período, o conteúdo de RNAlater[®] foi totalmente removido, e os criotubos contendo somente a porção de tecido hepático foram armazenados em *freezer* a - 80°C até posterior

análise de quantificação de transcritos específicos pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).

A biópsia foi realizada nos quatro grupos experimentais definidos: novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) submetidas à alta (n = 8), e à baixa ingestão de matéria seca/energia (n = 8); e novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à alta (n = 8), e à baixa ingestão de matéria seca/energia (n = 8).

Sabe-se que o aumento agudo nas concentrações de insulina tem efeito sobre a expressão hepática de enzimas relacionadas ao metabolismo de P4 (LEMLEY, C. et al., 2008). Desta forma, com o intuito de avaliar-se o efeito crônico da dieta, e para não haver efeito de confundimento do aumento agudo da concentração de insulina sobre o efeito de dieta, e de grupo genético nos resultados de expressão gênica; o procedimento foi realizado em período pré – prandial, no terceiro dia (D2) após o início do protocolo hormonal (mesmo protocolo hormonal descrito no item 5.6., figura 10).

Figura 11. Instrumento automático Pro-Mag TM Ultra e agulha Pro-Mag TM Ultra I 2.5 (Ecomed, Brasil) utilizados para o procedimento de biópsia hepática.



Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

8. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

8.1 LOCAL

As análises biomoleculares referentes à abundância de transcritos dos genes *AKR1C4*, *AKR1D1*, *CYP3A4*, *CYP2C19*, *SRD5A1* e *SRD5A3* foram realizadas no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA da Universidade de São Paulo (USP), *campus* Pirassununga – SP; e Laboratório de Genética e Biotecnologia (LAGENBIO) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *campus* São Carlos – SP.

8.2 EXTRAÇÃO DE RNA

Inicialmente, cada amostra (aproximadamente 10 mg) de tecido hepático foi descongelada e o excesso de RNAlater[®] *Stabilization Solution* (ThermoFisher Scientific Inc., USA) foi removido com pipeta. Posteriormente, cada amostra foi separadamente submersa em nitrogênio líquido e macerada com auxílio de aparato de aço inoxidável pela aplicação de pressão sobre o tecido. Em seguida, o RNA foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), segundo recomendações do fabricante com pequenas modificações. Para tanto, resumidamente, em cada amostra foi adicionado 1 mL do reagente TRIzol. Posteriormente, a amostra foi submetida a centrifugação por 10 minutos, à 12.000 g, à 4°C. Então, a primeira fração do sobrenadante rica em gordura foi descartada, e o restante foi depositado em um novo tubo com 5 µL de acrilamida linear (Ambion Inc., Austin, TX, USA). Em seguida, foi realizado o acréscimo de 200 µL de clorofórmio para separar a solução aquosa e orgânica por centrifugação (12.000 g à 4°C). Por fim, o RNA presente na fase aquosa foi precipitado por adição de álcool isopropílico. Nesta etapa de precipitação com o isopropanol, foi adicionado 250 µL de água e 750 µL de isopropanol para melhorar a precipitação do RNA. A concentração de RNA foi mensurada por espectrofotômetro de pequeno volume (NanoDrop, Thermo Scientific, Wilmington, U.S.A.).

8.3 TRATAMENTO COM DNASE E SÍNTESE DE cDNA

Após a extração, o RNA foi dissolvido em 10 µl de solução de Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (DNase I, Amp Grade; Invitrogen™, Life Technologies) e 1 UI/ µl de Rnase OUT (Life Technologies), conforme sugerido pelo fabricante, para degradação de DNA contaminante.

O tratamento com DNase I foi realizado em temperatura ambiente utilizando 1,0 µg de RNA em reação com volume de 10 µL. Após incubação por 15 min foi adicionado 1,0 µL de EDTA (25mM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e a amostra foi aquecida à 65°C durante 10 min para a inativação da DNase. Imediatamente após o tratamento com DNase, realizou-se a transcrição reversa (RT). Preparou-se 10 µL de solução contendo tampão para RT (2,0 µL), dNTP mix (0,8 µL), *primers* randômicos (2,0 µL), inibidor de RNase (0,25 µL), transcriptase reversa (1,0 µL) e água livre de nucleases (3,95 µL), seguindo instruções do fabricante (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, LifeTechnologies™, Frederick, Maryland, USA). Em seguida, a solução de RT(10 µl) foi adicionada aos 11,0 µl de amostras tratadas com DNase I. As amostras permaneceram sob incubação durante 10 min a 25°C e por 2 h a 37°C, seguido por inativação da transcriptase reversa à 85°C por 5 min. Por fim as amostras foram estocadas a -20 °C até o uso.

8.4 DESENHO DE PRIMERS

Os *primers* senso e anti-senso (quadro 1), foram obtidos por meio de publicações científicas publicadas, ou desenhados utilizando a ferramenta Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Para tanto, foram utilizadas as sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Sempre que possível pelo menos um dos *primers* foi desenhado sobre junções éxon – éxon para evitar a amplificação de DNA genômico contaminante. Tais junções foram encontradas utilizando-se o programa *Genome Browser Gateway*, disponível no *site* USDC Genome Bioinformatics (<http://genome.usc.edu/idex.html>). O programa Blast® “Basic Local Alignment Search Tool” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi utilizado para avaliar a especificidade dos *primers*. A ferramenta *Oligo Analyzer 3.1* (<http://>

ww.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/) foi utilizada para avaliar a qualidade dos *primers* levando em consideração a probabilidade de formação de homodímeros, heterodímeros e *hairpins*. Os *primers* foram sintetizados pela Sigma-Aldrich.

8.5 VALIDAÇÃO DOS *PRIMERS*

As reações de PCR em tempo real (qPCR) foram executadas em equipamento QuantStudio[®] 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems[®] - Life Technologies Corporation, Frederick, Maryland, USA). O equipamento foi programado para iniciar com estágio de espera (95°C por 10 minutos), seguido por 40 ciclos compostos por fase de desnaturação (95°C por 15 minutos) e anelamento/extensão (60°C por 1 minuto). A curva de dissociação (“melting”) foi obtida imediatamente após amplificação.

Os *primers* liofilizados foram diluídos em água ultra pura livre de DNase e RNase (Life Technologies) originando soluções estoque com concentração de 100 uM. As soluções de trabalho com concentração de 3 uM foram preparadas por rediluição das soluções de estoque. Ambas as soluções foram armazenadas a - 20°C.

As reações de qPCR continham uma mistura de soluções contendo os *primers* senso e anti-senso, solução *Master Mix*, pré-preparada (Power SYBR[®] Green PCR Master Mix, Life Technologies Corporation, Frederik, Maryland, USA) e água totalizando 13,0 µL. A esta solução foram adicionados 2,0 µL de solução contendo cDNA, exceto os poços que serviram como controle negativo que receberam 2,0 µL de água ultra pura. A solução de cDNA foi normalmente diluída em água a 1:10, a menos que especificamente mencionado.

Foram realizados testes com o intuito de encontrar concentrações de *primers* que estabelecessem maior eficiência nas reações de qPCR. Os critérios para escolha de maior concentração de *primers* foram: eficiência de amplificação entre 95 e 105%, ausência de amplificação no controle negativo, único pico de curva de *melting* e menor ciclo limiar (cycle threshold; Ct).

Primeiramente, foram realizados testes nas concentrações de 200 nM para cada par de *primers*, e quando necessário, concentrações maiores ou menores foram testadas. Cada concentração foi testada em duplicata e com

um poço usado como controle negativo. No mínimo três curvas padrão composta por cinco pontos em duplicata, contendo pool de cDNA diluído, foram analisadas por diluição serial do cDNA (1:5). Para verificação da eficiência de amplificação, uma regressão linear de primeiro grau foi ajustada para o log da quantidade de cDNA versus o valor do Ct (limiar ou o valor do delta Ct). O delta Ct foi calculado pela subtração dos valores do Ct do gene alvo e Ct do gene endógeno. A eficiência de amplificação de cada par de *primers* foi estimada baseada nos valores do *slope* da regressão linear (log da quantidade de cDNA vs. valores de Ct) como se segue: Eficiência = $10^{(-1/slope)}$. Para comparação da eficiência de amplificação entre os ensaios dos genes alvo e dos genes endógenos considerou-se os valores do *slope* da outra regressão linear (log da quantidade de cDNA vs. valores de delta Ct). Neste caso, quando os valores do *slope* foram iguais ou menores que 0,1, a análise da expressão relativa pode ser realizada assumindo-se que a eficiência de amplificação dos genes alvo em relação aos endógenos é igual.

Os dados de amplificação foram analisados pelo programa (Software v.2.2.2, Life Technologies Frederick, Maryland, USA). Foram consideradas validadas as curvas padrão com eficiência entre 85 e 110% e coeficiente de determinação (R^2) próximo a 1. Estabelecidas as validações foram realizadas reações para comparar a abundância de cada transcrito entre os grupos experimentais. Todas as amostras e os controles negativos foram analisados em duplicata. A quantificação de transcritos presentes nas amostras foi realizada de forma relativa à média geométrica da expressão de três genes de referência – *ACTB* (Actin, Beta), *GAPDH* (Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase) e *PPIA* [Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)], segundo (MACABELLI et al., 2014).

Quadro 1. Nomenclatura, *primers forward* (F) e *reverse* (R), sequência de *primers*, identificação representativa (ID) e números de pares de bases dos genes.

Nomenclatura do gene	Gene	Sequência 5' - 3'	ID	N° PB	
Actin, Beta	ACTB_F	CCAGTTCGCCCATGGATGATGATA	NM_173979.3		144
	ACTB_R	ACCATTACGCCCTGGTGCC			
Aldo - keto reductase, family 1, member C4	AKR1C4_F	ATCGATGGCCTCAACAGCAA	NM_181027.2		59
	AKR1C4_R	GGGTGACCAACACCCAGTAA			
Aldo - keto reductase, family 1, member D1	AKR1D1_F	GCTTGCAAAGATGCTGGCTT	NM_001192358.1		130
	AKR1D1_R	ATGGATGGCACTCAACCTGG			
Cytochrome P450, family IIA, polypeptide 4	CYP3A4_F	ACAATCATAAAGCTCTCTCTGACCA	NM_001099367.1		124
	CYP3A4_R	TCAGGTGAGTGCCAAAAT			
Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19	CYP2C19_F	TCAGCAGGAAAAAGAGTTTGTGT	NM_001109792.2		141
	CYP2C19_R	CCCTTTGAAACTTGGTGCAGT			
Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase	GAPDH_F	AGGTCGGAGTGAACGGATTTC	NM_001034034.2		85
	GAPDH_R	ATGGCGACGATGCCACTTT			
Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	PPIA_F	CGCGTCTCTTTTGAGCTGTT	NM_178320.2		144
	PPIA_R	GTCACCACCCTGGCACATAA			
Steroid - 5 - alpha - reductase, alpha polypeptide 1	SRD5A1_F	GCCGCTGTATGCCCTTCCTAT	NM_001099137.1		141
	SRD5A1_R	AACCACAAAGGCAGAACCTGT			
Steroid - 5 - alpha - reductase 3	SRD5A3_F	ACGGCAGGAACGCTCTATGTG	NM_001206090.1		67
	SRD5A3_R	CCGAGGATATGGAACCACCG			

Fonte: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em 31 ago.2015.

9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do software *Statistical Analysis System for Windows SAS*[®] (SAS 9.3). As médias apresentadas foram ajustadas pelo comando LSMEANS deste procedimento. Foram considerados no modelo os efeitos fixos de Raça (R_j) e Dieta (D_i), e a interação Raça*Dieta (R_jD_i), além do efeito aleatório de período (P_k), de acordo com o modelo: $Y_{ijk} = \mu + R_j + D_i + R_jD_i + p_k + e_{ijk}$.

Os dados de concentração de P4 ao longo tempo não apresentaram distribuição normal e foram transformados para raiz quadrada.

A variável de distribuição binária como taxa de estro e taxa de ovulação foram analisadas utilizando-se o PROC GLIMMIX do SAS 9.3. As variáveis de medidas repetidas no tempo foram analisadas utilizando-se o PROC MIXED, do SAS 9.3. Foram considerados os efeitos de raça, dieta, tempo e suas interações. O resíduo foi estimado pelo efeito do animal dentro de raça e dieta. O método de Akaike foi utilizado na escolha da melhor matriz de covariância. Para todas as variáveis, foi considerada significância ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados de expressão gênica foram avaliados utilizando-se o PROC GLIMMIX. O modelo considerado foi o seguinte: $y = \text{raça} + \text{protocolo} + \text{raça} \times \text{protocolo}$. Foi considerado valores de P menores que 0,05. No caso de efeitos principais ou de interação que fossem significantes, estes foram analisados pelo teste Posthoc t – Student.

10. RESULTADOS

10.1 DINÂMICA FOLICULAR

Considerando todo o período experimental, as novilhas da raça Nelore apresentaram maior média de peso ($P < 0,0001$), que novilhas Holandesas. Ainda, como esperado, as novilhas que foram submetidas à alta ingestão de matéria seca/energia apresentaram maior peso médio ($P = 0,006$), que as novilhas submetidas à baixa ingestão de matéria seca/energia; independente da raça avaliada (raça * dieta, $P = 0,95$; tabela 2).

Considerando o ganho de peso médio diário, as novilhas submetidas à alta ingestão de matéria seca/energia apresentaram maior ganho de peso diário ($P < 0,0001$), que as novilhas submetidas à baixa ingestão de matéria seca/energia, independente da raça avaliada (raça * dieta; $P = 0,61$). Ainda, a média de ganho de peso diário foi similar entre os grupos genéticos ($P = 0,37$; tabela 2).

O tratamento com CIDR[®] e BE no início do protocolo hormonal resultou na emergência de uma nova onda de crescimento folicular em ambos os grupos genéticos. No entanto, particularmente três novilhas Holandesas do grupo de alta ingestão de matéria seca/energia não emergiram uma nova onda de crescimento folicular. Nestas novilhas, o folículo dominante presente no início do protocolo não regrediu ao tratamento com CIDR[®] e BE, e foi este folículo que ovulou ao final do protocolo hormonal. Além disso, duas novilhas da raça Holandesa, uma do grupo alta ingestão e outra do grupo baixa ingestão de matéria seca/energia, permaneceram durante o protocolo somente com folículos pequenos (< 5 mm) e não iniciaram nova onda de crescimento folicular durante o protocolo de sincronização. Considerando apenas os animais que emergiram uma nova onda de crescimento folicular, o intervalo entre o início do protocolo de sincronização e a emergência de uma nova onda de crescimento folicular foi similar ($P = 0,41$) entre as raças [Holandesa ($n = 30$): $3,3 \pm 0,2$ d vs. Nelore ($n = 32$): $3,1 \pm 0,2$ d], como também entre os diferentes protocolos de fornecimento de dieta [Alta ingestão ($n = 31$): $3,1 \pm 0,2$ d vs. Baixa ingestão ($n = 31$): $3,3 \pm 0,2$ d; $P = 0,20$; tabela 3].

Independente da dieta fornecida (raça*dieta; $P = 0,96$), verificou-se maior ($P < 0,0001$) número de folículos recrutados no início da onda de crescimento folicular em novilhas da raça Nelore que em novilhas Holandesas [Nelore ($n = 32$): $42,1 \pm 3,4$ e Holandesa ($n = 30$): $23,5 \pm 3,3$]. No entanto, o número de folículos recrutados foi similar ($P = 0,62$) para novilhas submetidas à alta e baixa ingestão de matéria seca/energia [Alta ingestão ($n = 31$): $33,7 \pm 3,3$ e Baixa ingestão ($n = 31$): $31,9 \pm 3,3$; tabela 3].

O diâmetro do folículo dominante no dia 8 (FD8) e no dia 10 (FD10) do protocolo de sincronização, e diâmetro máximo do folículo dominante (DMFD) após a retirada do dispositivo de P4 foi menor (FD8: $P = 0,04$; FD10: $P = 0,001$; DMFD: $P = 0,009$) em novilhas da raça Nelore ($n = 32$) que em novilhas da raça Holandesa ($n = 30$), independente da dieta administrada [FD8 (mm): $10,3 \pm 0,4$ vs. $11,6 \pm 0,4$; FD10 (mm): $12,2 \pm 0,4$ vs. $14,4 \pm 0,4$; DMFD (mm): $13,0 \pm 0,4$ vs. $14,5 \pm 0,4$; tabela 4]. Da mesma forma, independente da raça avaliada, foi observado menor diâmetro do folículo dominante no dia 8 ($P < 0,0001$), no dia 10 ($P = 0,001$) e diâmetro máximo do folículo dominante ($P = 0,0004$) ao final do protocolo hormonal em novilhas submetidas à baixa ingestão ($n = 31$) comparadas a alta ingestão ($n=31$) de matéria seca/energia [FD8 (mm): $9,6 \pm 0,4$ vs. $12,2 \pm 0,4$; FD10 (mm): $12,2 \pm 0,43$ vs. $14,3 \pm 0,4$; DMFD (mm): $12,7 \pm 0,4$ vs. $14,8 \pm 0,4$, tabela 4]. No entanto, não foi observada diferença entre as raças para diâmetro de folículo ovulatório [Nelore ($n = 32$): $13,8 \pm 0,3$ mm e Holandesas ($n = 30$): $13,5 \pm 0,3$ mm; $P = 0,52$; tabela 4]. Entretanto, independente da raça (raça * dieta, $P = 0,98$), novilhas submetidas à baixa ingestão de matéria seca/energia apresentaram diâmetro do folículo ovulatório menor ($P = 0,001$) comparadas às de alta ingestão de matéria seca/energia [Baixa ingestão ($n = 31$): $12,8 \pm 0,3$ vs. Alta ingestão ($n = 31$): $14,4 \pm 0,3$ mm; tabela 4].

Quando se avaliou o diâmetro do folículo dominante durante o protocolo hormonal (do dia da sua emergência até se tornar folículo dominante) foi observado efeito de raça e dieta conforme o dia (tempo) do protocolo (dieta * tempo, $P = 0,06$; raça * tempo, $P < 0,001$). Ambos, efeito de dieta e de raça, começaram a ser significativos ($P < 0,05$) a partir do dia 6 do protocolo hormonal (figura 12, 13 e 14).

Independente do protocolo de fornecimento de dieta (raça * dieta, $P = 0,79$), a taxa de crescimento folicular diária (mm/dia) foi menor ($P = 0,0001$) em novilhas da raça Nelore que em novilhas da raça Holandesa [Nelore ($n = 32$): $1,0 \pm 0,04$ e Holandesa ($n = 30$): $1,2 \pm 0,04$]. Além disso, novilhas submetidas à alta ingestão de matéria seca/energia apresentaram maior taxa de crescimento folicular ($P = 0,01$) que novilhas submetidas à baixa ingestão de matéria seca/energia [Alta ingestão ($n = 31$): $1,2 \pm 0,04$ e Baixa ingestão ($n = 31$): $1,0 \pm 0,04$], independente da raça envolvida (raça * dieta, $P = 0,79$; tabela 4).

O intervalo entre a remoção do CIDR[®] e a ovulação foi maior ($P = 0,07$) em novilhas da raça Nelore comparada às Holandesas [Holandesa ($n = 30$): $69,2 \pm 0,9$ h e Nelore ($n = 32$): $71,04 \pm 0,7$ h]. No entanto, o momento da ovulação não foi influenciado ($P = 0,40$) pela dieta fornecida [Alta ingestão ($n = 31$): $69,9 \pm 0,9$ h e Baixa ingestão ($n = 31$): $70,2 \pm 0,84$ h, tabela 5]. Novilhas Holandesas apresentaram maior taxa de ovulação que novilhas da raça Nelore [93,7 % (30/32) vs. 78,13% (25/32)]; $P = 0,04$), e esta diferença ocorreu independente da dieta fornecida (raça * dieta, $P = 0,82$). Ainda, a alta ou baixa ingestão de matéria seca/energia fornecida às novilhas não influenciou a taxa de ovulação entre os grupos [Alta: 87,5 % (28/32) vs. Baixa: 84,4%; (27/32); $P = 0,72$; figura 15).

O intervalo entre a remoção do CIDR[®] e o início de comportamento de estro foi menor ($P = 0,005$) para novilhas Holandesas, comparada às novilhas da raça Nelore [Nelore ($n = 27$): $45,9 \pm 0,9$ h e Holandesa ($n = 29$): $50,2 \pm 1,1$ h]. No entanto, não foi verificado efeito de dieta ($P = 0,16$) para o momento de manifestação do estro [Alta ingestão ($n = 29$): $48,8 \pm 1,0$ h e Baixa ingestão ($n = 27$): $47,1 \pm 1,1$ h, tabela 5].

O diâmetro (mm) e volume (mm³) do CL foram menores para novilhas da raça Nelore, que para novilhas da raça Holandesa, tanto no dia 14 (Diâmetro - D14: $14,0 \pm 0,5$ vs. $16,7 \pm 0,5$; $P = 0,001$; Volume - D14: 2553 ± 199 vs. 1478 ± 218 ; $P = 0,0006$), como no dia 17 após o início do protocolo (Diâmetro - D17: $18,6 \pm 0,6$ vs. $22,7 \pm 0,6$; $P < 0,0001$; Volume - D17: 6195 ± 427 vs. 3507 ± 461 ; $P < 0,0001$), independente da dieta fornecida (tabela 6). Nesses mesmos momentos, novilhas submetidas à baixa ingestão de matéria seca/energia apresentaram diâmetro e volume de CL menor, que novilhas submetidas à alta ingestão de matéria seca/energia (Diâmetro - D14: $14,4 \pm 0,5$ vs. $16,3 \pm 0,5$; P

= 0,01; Diâmetro – D17: $19,7 \pm 0,6$ vs. $21,6 \pm 0,6$; $P = 0,02$; Volume – D14: 1610 ± 211 vs. 2421 ± 206 ; $P = 0,008$; Volume – D17: 4278 ± 447 vs. 5424 ± 442 ; $P < 0,04$), independente da raça avaliada (tabela 6).

Tabela 2. Peso vivo (PV), ganho de peso diário (GPD) e escore de condição corporal (ECC) durante o período experimental de novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à dieta de alta e baixa ingestão de matéria seca/energia. Dados apresentados como média \pm E.P.M.

	Holandesa		Nelore		P		
	Alta (n=16)	Baixa (n=16)	Alta (n=16)	Baixa (n=16)	Raça	Dieta	Raça*Dieta
PV (Kg)	$395,6 \pm 7,9$	$372,4 \pm 7,9$	$499,5 \pm 7,4$	$477,5 \pm 7,4$	$< 0,0001$	0,006	0,95
GPD	$1,05 \pm 0,08$	$-0,08 \pm 0,08$	$1,08 \pm 0,08$	$0,04 \pm 0,08$	0,37	$< 0,0001$	0,61
ECC	$3,45 \pm 0,04$	$2,84 \pm 0,04$	$3,42 \pm 0,04$	$2,90 \pm 0,04$	0,69	$< 0,0001$	0,23

Tabela 3. Início da nova onda de crescimento folicular (IONDA) e número de folículos recrutados (NFOL) em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e da raça Holandesa (*Bos taurus*), submetidas à alta e baixa ingestão de matéria seca/energia. Dados apresentados como média \pm E.P.M.

	Holandesa		Nelore		P		
	Alta (n=13)	Baixa (n=15)	Alta (n=16)	Baixa (n=16)	Raça	Dieta	Raça*Dieta
NFOL	$24,5 \pm 3,4$	$22,6 \pm 3,1$	$42,7 \pm 4,6$	$41,4 \pm 3,2$	$< 0,0001$	0,62	0,96
IONDA(d)	$3,2 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,2$	0,41	0,20	0,83

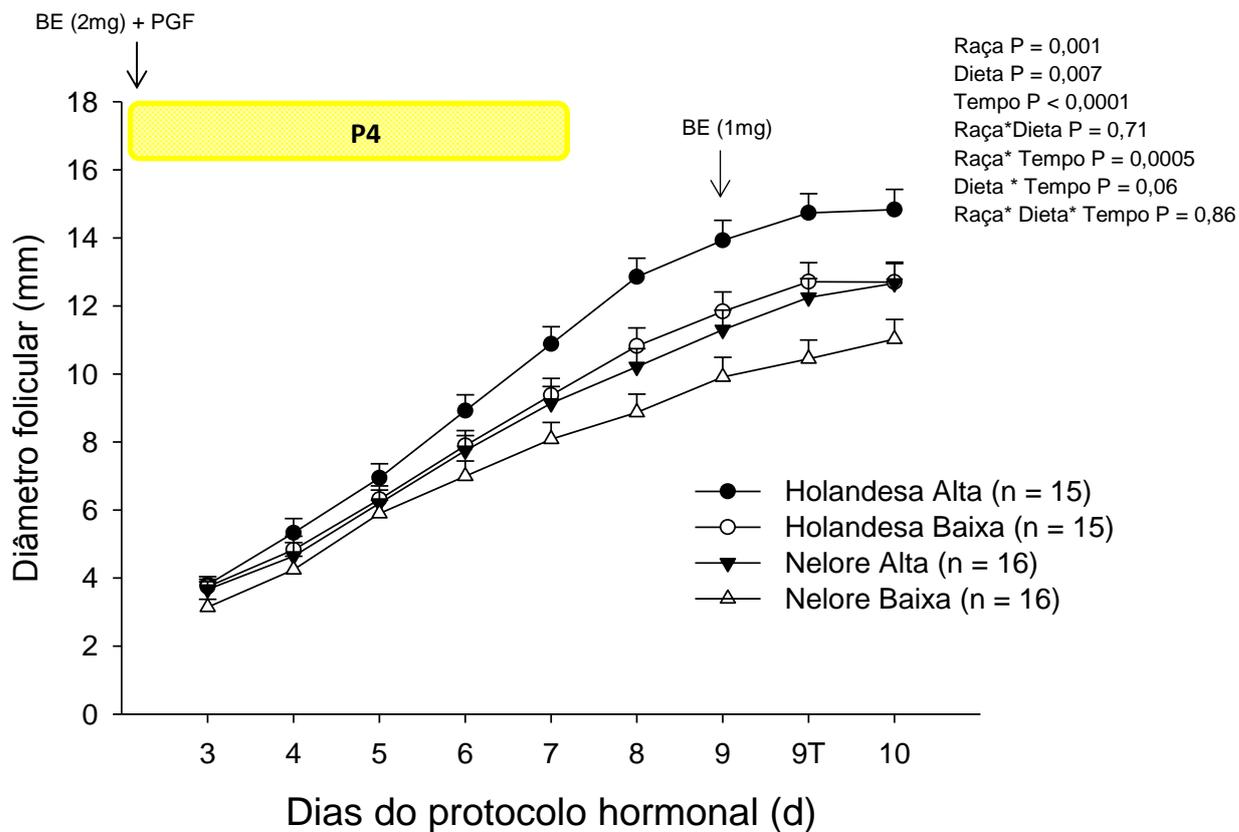
\pm E.P.M.

Tabela 4. Diâmetros do folículo dominante no dia 8 (FD8) e no dia 10 (FD10), diâmetro máximo do folículo dominante (DMFD) ao final do protocolo, diâmetro do folículo ovulatório (FO) e taxa de crescimento folicular (TC), em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à alta e baixa ingestão de matéria seca/energia. Dados apresentados como média \pm E.P.M.

	Holandesa		Nelore		P		
	Alta (n=15)	Baixa (n=15)	Alta (n=16)	Baixa (n=16)	Raça	Dieta	Raça*Dieta
FD8 (mm)	$12,9 \pm 0,8$	$10,2 \pm 0,5$	$11,5 \pm 0,4$	$9,0 \pm 0,6$	0,04	$< 0,0001$	0,89
FD10 (mm)	$15,3 \pm 0,7$	$13,4 \pm 0,4$	$13,4 \pm 0,7$	$11,1 \pm 0,7$	0,001	0,001	0,8
DMFD (mm)	$15,6 \pm 0,7$	$13,5 \pm 0,4$	$14,1 \pm 0,6$	$11,9 \pm 0,5$	0,009	0,0004	0,9
TC (mm/d)	$1,3 \pm 0,07$	$1,1 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,05$	0,0001	0,01	0,79

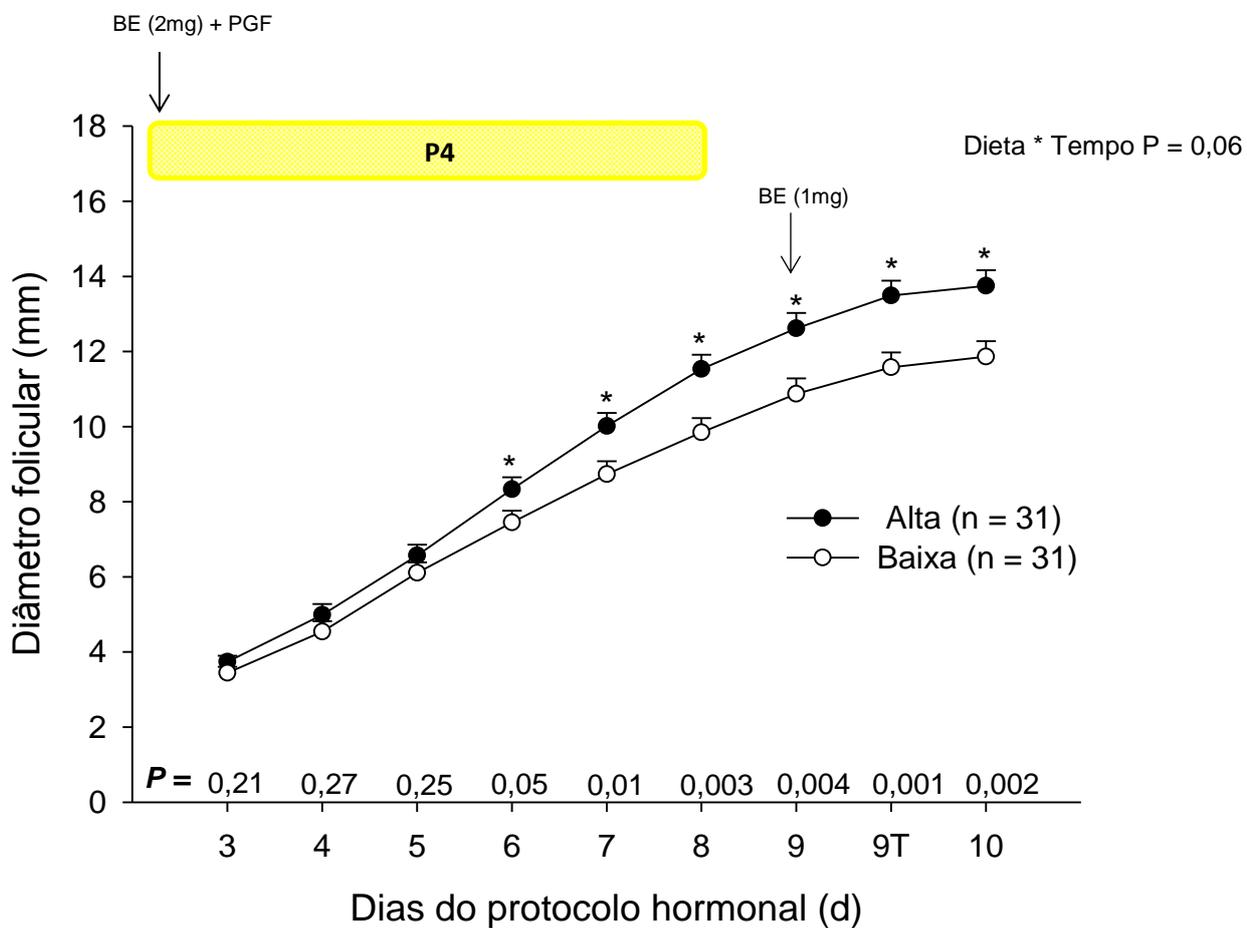
	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Raça	Dieta	Raça*Dieta
	(n = 15)	(n = 15)	(n = 13)	(n = 12)			
FO (mm)	$14,6 \pm 0,7$	$12,9 \pm 0,4$	$14,3 \pm 0,4$	$12,6 \pm 0,3$	0,517	0,001	0,98

Figura 12. Diâmetro do folículo dominante (mm) de novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas às dietas de alta e baixa ingestão de matéria seca/energia, sincronizadas com benzoato de estradiol (BE) e dispositivo intravaginal de progesterona (P4). Dados apresentados como média \pm EPM.



Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

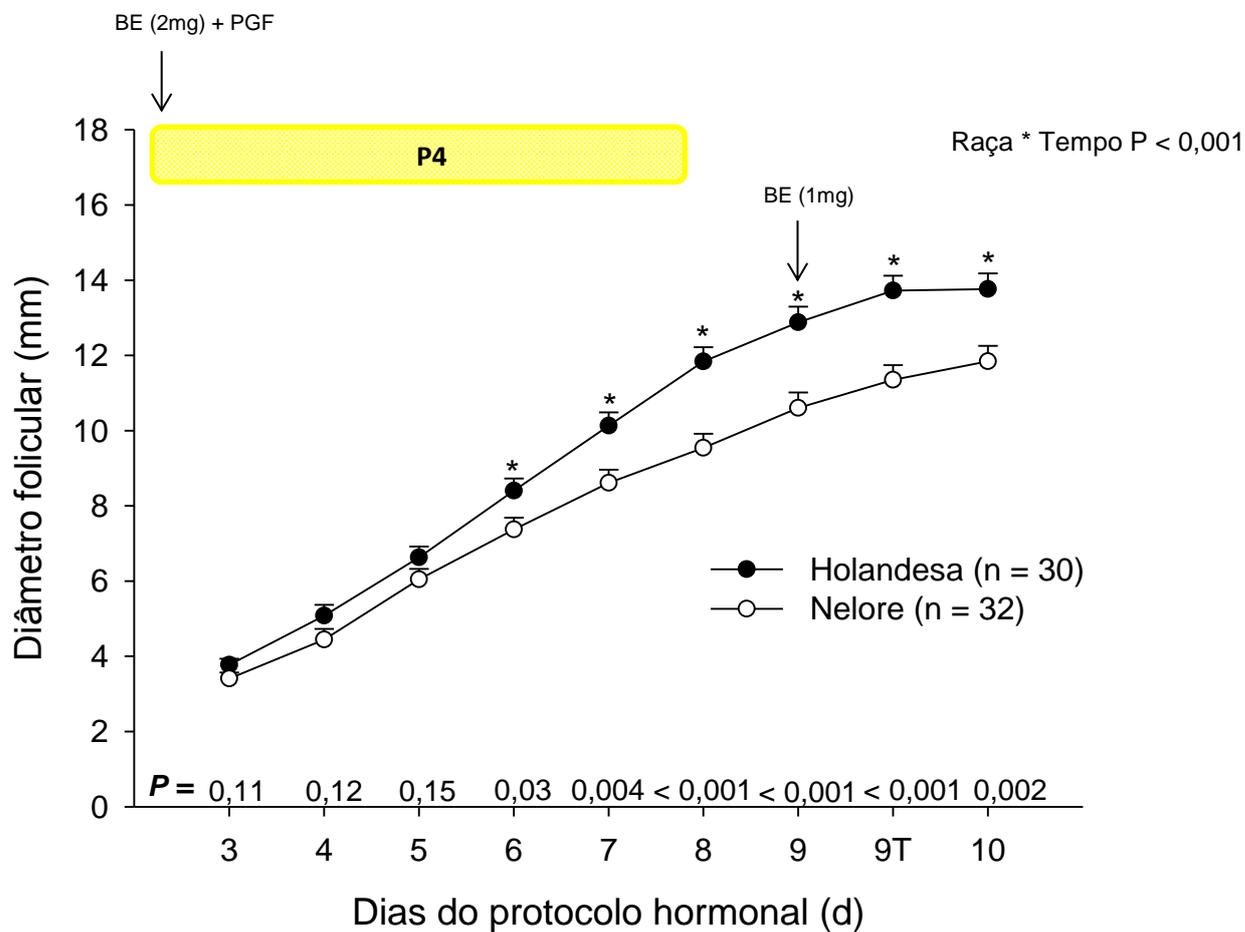
Figura 13. Diâmetro do foliculo dominante (mm) de novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à dieta de alta e baixa ingestão de matéria seca/energia durante o protocolo de sincronização com benzoato de estradiol (BE) e dispositivo intravaginal de progesterona (P4), independente da raça avaliada. Dados apresentados como média \pm EPM.



Legenda: * P < 0,05

Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

Figura 14. Diâmetro do folículo dominante de novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e da raça Holandesa (*Bos taurus*) tratadas com benzotao de estradiol (BE) e dispositivo intravaginal de progesterona (P4), independente da dieta fornecida. Dados apresentados como média \pm EPM.



Legenda: * P < 0,05

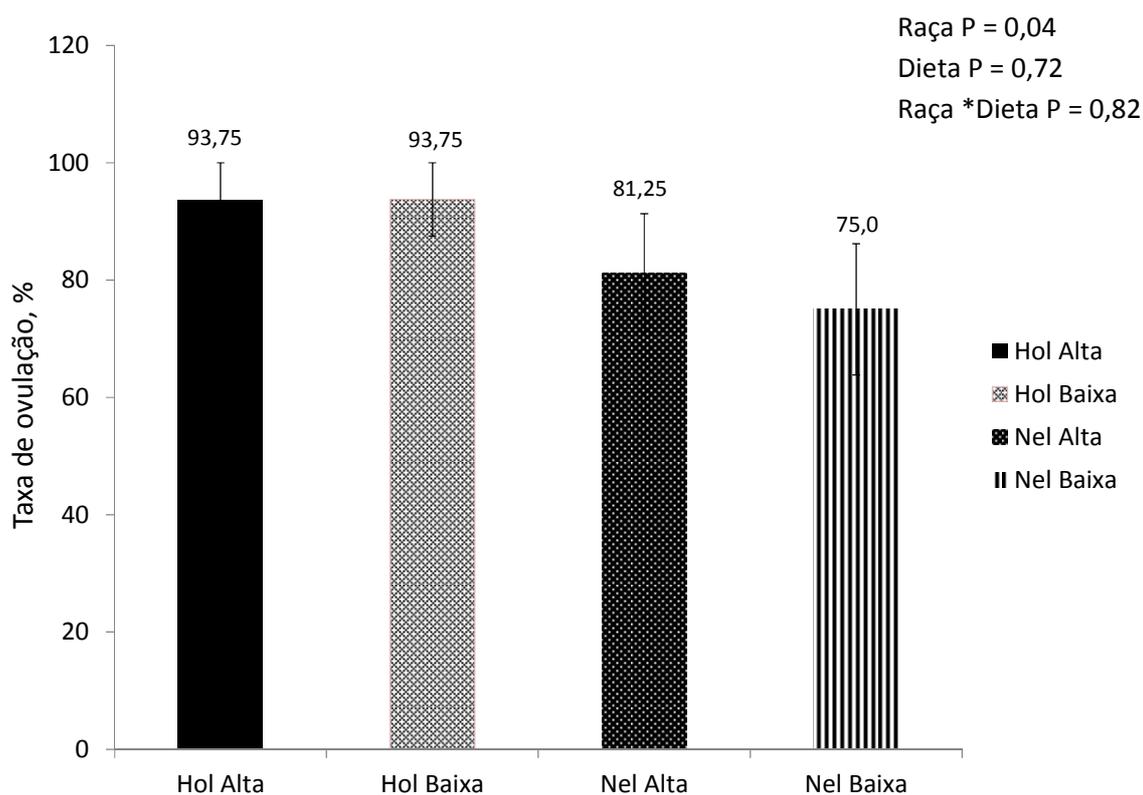
Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

Tabela 5. Intervalo entre a retirada do dispositivo de P4 e a ovulação (MO) e a manifestação do comportamento de estro (ME) em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e da raça Holandesa (*Bos taurus*), submetidas à baixa e a alta ingestão de matéria seca/energia. Dados

	Holandesa		Nelore		P		
	Alta (n=16)	Baixa (n=16)	Alta (n=16)	Baixa (n=16)	Raça	Dieta	Raça*Dieta
MO (h)	68,8 ± 1,4	69,6 ± 1,3	71,1 ± 0,9	71,0 ± 1,0	0,07	0,4	0,72
<hr/>							
	Alta (n=14)	Baixa (n=15)	Alta (n=15)	Baixa (n=12)			
ME (h)	46,3 ± 1,2	45,6 ± 1,3	51,2 ± 1,4	49,0 ± 1,78	0,005	0,16	0,59

apresentados como média ± E.P.M.

Figura 15. Taxa de ovulação ao final do protocolo de sincronização da ovulação em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) submetidas à dieta de alta (n = 16) e baixa (n = 16) ingestão de matéria seca/energia e em novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à dieta de alta (n = 16) e baixa (n = 16) ingestão de matéria seca



Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

Tabela 6. Diâmetro de corpo lúteo no dia 14 (CLD14), no dia 17 (CLD17); e volume do CL no dia 14 (VOL14) e dia 17 (VOL17) após o início do protocolo de sincronização em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à dieta de alta e baixa ingestão de matéria seca/energia. Dados apresentados como média \pm E.P.M.

	Holandesa		Nelore		P		
	Alta (n=15)	Baixa (n=15)	Alta (n=13)	Baixa (n=12)	Raça	Dieta	Raça*Dieta
CLD14 (mm)	18,1 \pm 1,1	15,3 \pm 0,7	14,6 \pm 0,5	13,4 \pm 0,4	0,001	0,01	0,30
CLD17(mm)	23,6 \pm 1,0	21,8 \pm 1,0	19,6 \pm 0,5	17,6 \pm 0,6	<0,0001	0,02	0,90
VOL14 (mm ³)	3165 \pm 455	1941 \pm 244	1677 \pm 143	1280 \pm 96	0,0006	0,008	0,17
VOL17 (mm ³)	6872 \pm 878	5517 \pm 695	3977 \pm 309	3038 \pm 251	<0,0001	<0,0001	0,91

10.2 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE P4

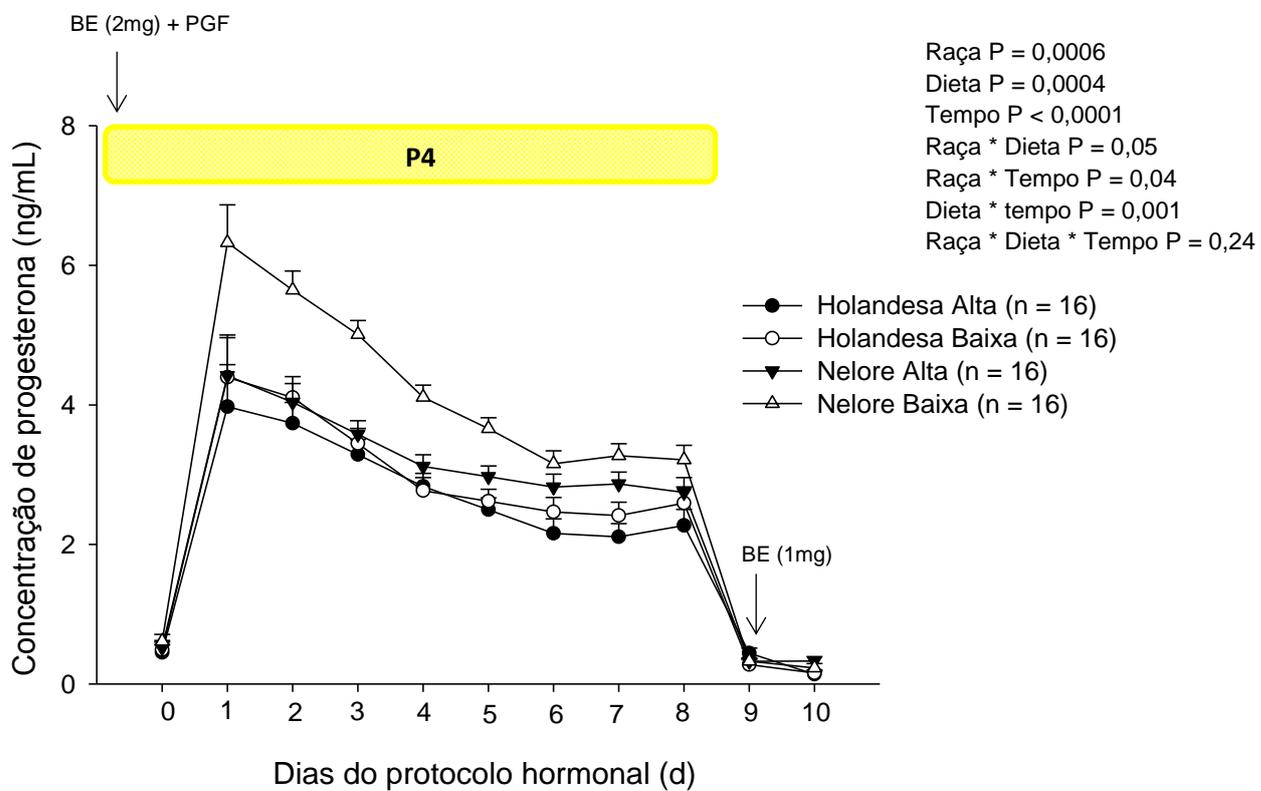
Ao longo do protocolo hormonal de sincronização da ovulação com P4 e BE as novilhas da raça Nelore apresentaram maior concentração de P4 que as novilhas Holandesas ($P = 0,0006$); assim como novilhas submetidas à baixa ingestão comparadas as novilhas submetidas à alta ingestão de matéria seca/energia ($P = 0,0004$; figura 16). No entanto, verificou-se interação dupla dos efeitos raça e dieta (raça * dieta, $P = 0,05$). Quando se interpreta esta interação, verifica-se que a diferença na concentração de P4 das novilhas da raça Nelore submetidas à alta e baixa ingestão de matéria seca/energia é maior que a diferença das novilhas Holandesas submetidas às mesmas dietas durante o protocolo hormonal. Entretanto, tanto novilhas Nelore ($P < 0,0001$), quanto Holandesas ($P = 0,09$) apresentaram maior concentração de P4 quando submetidas à baixa ingestão de matéria seca/energia do dia D1 ao D8 do protocolo de sincronização.

Também, pode-se observar que o efeito de raça variou conforme o tempo [raça * tempo ($P = 0,04$)], assim como o efeito de dieta [dieta * tempo ($P = 0,001$)]. Observa-se que o efeito de raça só não é significativo no início (D0) e no final (D10) do protocolo de sincronização, sendo que em todos os outros períodos a concentração de P4 foi maior em novilhas Nelore comparada as Holandesas (figura 16). Da mesma forma, na análise da interação dieta * tempo, pode-se observar que novilhas submetidas à alta e baixa ingestão de matéria seca/energia têm concentração de P4 similar no início (D0) e final (D9 e D10) do protocolo hormonal. Em todos os outros dias do protocolo de

sincronização da ovulação a concentração de P4 em novilhas submetidas à baixa ingestão foi maior comparada às novilhas submetidas à alta ingestão de matéria seca/energia.

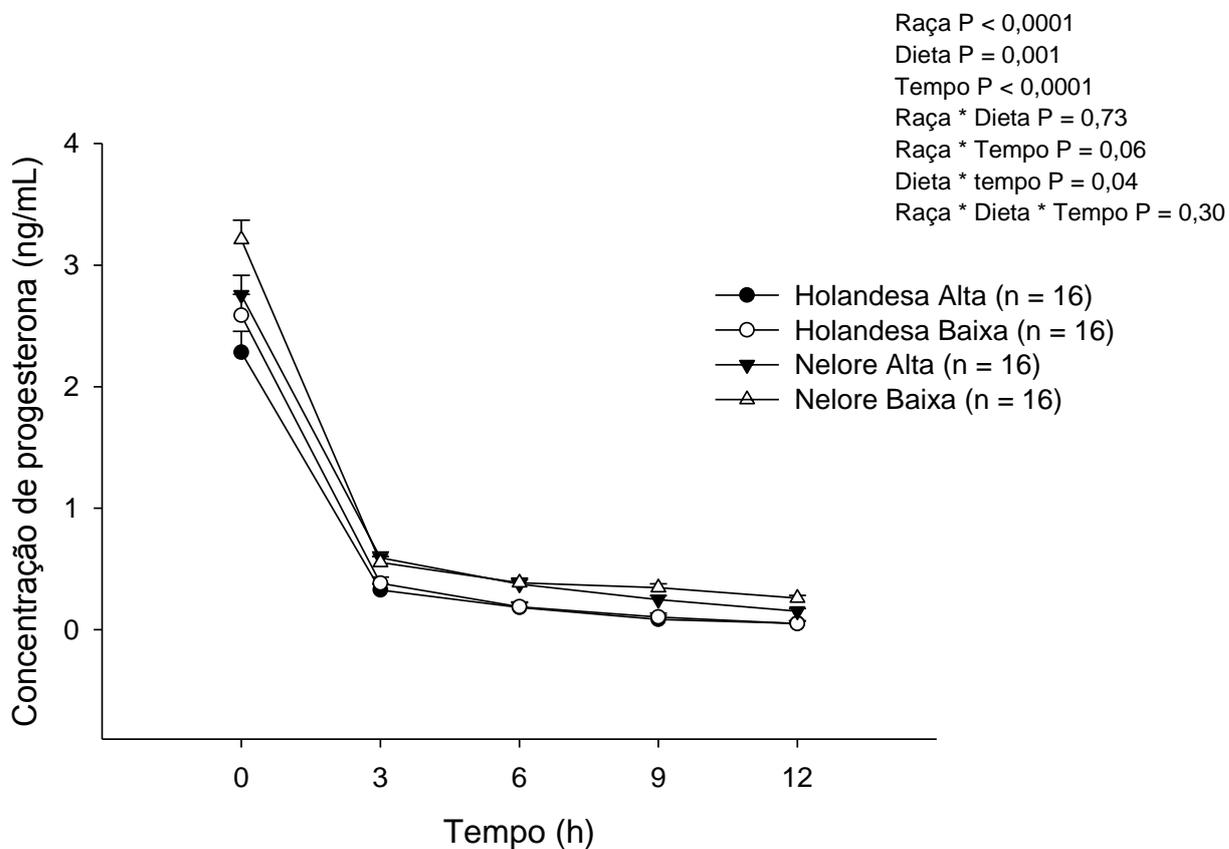
No dia da retirada do CIDR[®] (D8) foi observado efeito de raça e dieta para concentração plasmática de P4 avaliada a cada 3 horas (momento 0, 3, 6, 9 e 12 h). Nestes momentos, a concentração de P4 foi maior para novilhas Nelore que Holandesas. Além disso, novilhas submetidas à baixa ingestão apresentaram maiores concentrações de P4 que novilhas submetidas à alta ingestão de matéria seca/energia (figura 17). Ainda, verificou-se interação raça * tempo ($P=0,03$) e dieta * tempo ($P=0,02$).

Figura 16. Concentração plasmática de progesterona (P4) durante protocolo de sincronização da ovulação em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à alta e baixa ingestão de matéria seca/energia. Dados apresentados como média \pm EPM.



Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

Figura 17. Concentração plasmática de progesterona (P4) após a retirada do dispositivo intravaginal de P4 (D8) em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à alta e baixa ingestão de matéria seca/energia. Sangue colhido a cada 3 h do momento da retirada do dispositivo até 12 h. Dados apresentados como média \pm EPM.

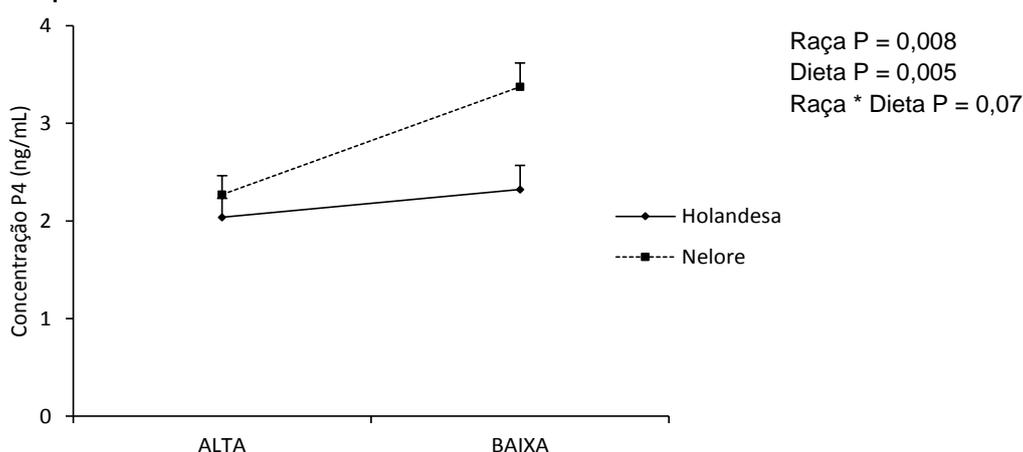


Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

9.3 BIÓPSIA HEPÁTICA – P4 E EXPRESSÃO GÊNICA

Em relação a concentração de P4 no dia da biópsia hepática, foi observado efeito de raça ($P = 0,008$), dieta ($P = 0,005$) e interação raça * dieta ($P = 0,07$). Ao avaliarmos essa interação, quando se compara novilhas da raça Nelore e Holandesas submetidas à alta ingestão de matéria seca/energia foi observado que a concentração de P4 foi similar entre as raças (Nelore: $2,3 \pm 0,2$ e Holandesa: $2,0 \pm 0,2$ ng/mL). No entanto, quando a avaliação é feita em ambas as raças submetidas à baixa ingestão de matéria seca/energia, verificou-se que novilhas da raça Nelore apresentam maior concentração de P4 que as novilhas da raça Holandesa (Nelore: $3,4 \pm 0,2$ e Holandesa: $2,3 \pm 0,2$ ng/mL). Ao se comparar novilhas Holandesas submetidas à alta e baixa ingestão de matéria seca/energia a concentração de P4 foi similar (Holandesa alta: $2,0 \pm 0,2$ e Holandesa baixa: $2,3 \pm 0,2$ ng/mL). Entretanto, novilhas Nelore apresentaram maior concentração de P4 quando submetidas à baixa comparada à novilhas submetidas à alta ingestão de matéria seca/energia (Nelore alta: $2,3 \pm 0,3$ e Nelore baixa: $3,4 \pm 0,2$ ng/mL; figura 18).

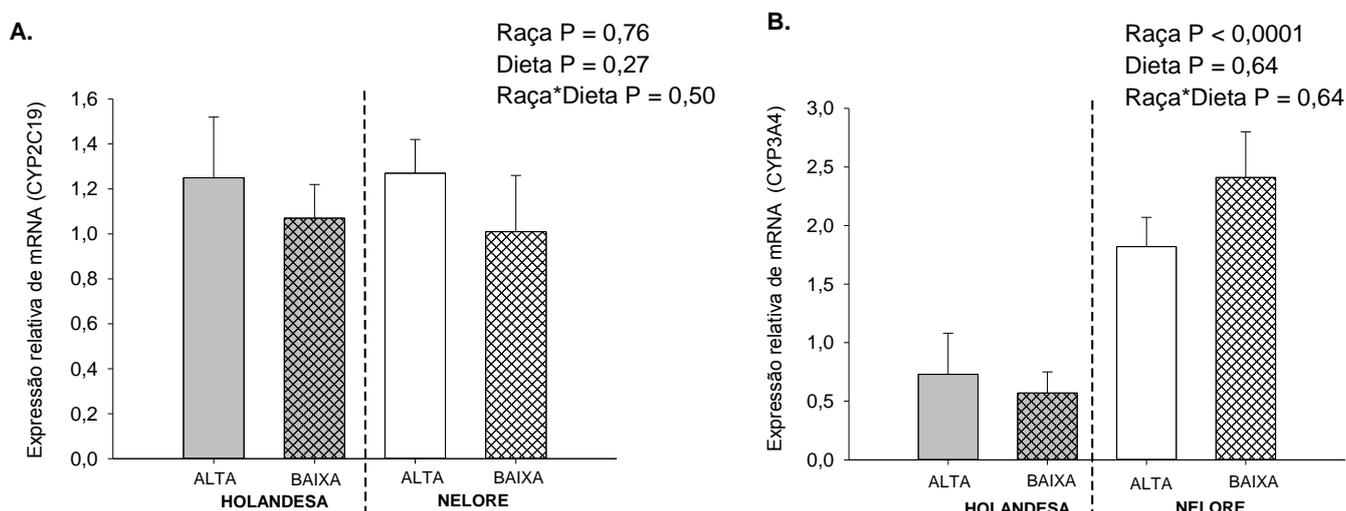
Figura 18. Concentração plasmática de progesterona (P4) em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*), submetidas à alta ($n = 8$) e baixa ingestão de matéria seca/energia ($n = 8$); e novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*), submetidas à alta ($n = 8$) e baixa ($n = 8$) ingestão de matéria seca/energia.



Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

Em relação aos genes da família citocromo P450, independente do protocolo de fornecimento de dieta (raça * dieta, $P = 0,64$), observou-se maior abundância de transcritos para o gene *CYP3A4* ($P < 0,0001$) em novilhas da raça Nelore que em novilhas da raça Holandesa. Para este mesmo gene, não foi observado efeito de dieta ($P = 0,62$) na abundância de transcritos (figura 19). Em relação a abundância de transcritos para o gene *CYP2C19*, não foi observado efeito de dieta ($P = 0,27$), como também de raça ($P = 0,76$; figura 19).

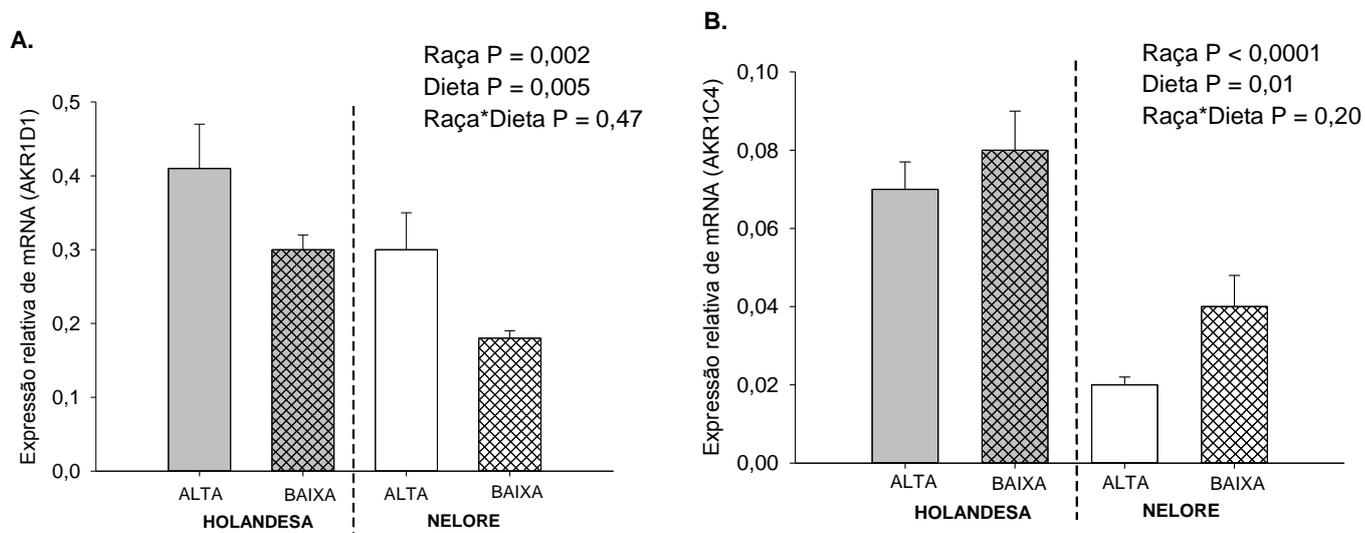
Figura 19. Expressão relativa de mRNA dos genes **A.** *CYP2C19* (citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídio 19); **B.** *CYP3A4* (citocromo P450, subfamília IIIA, polipeptídio 4) em novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à dieta de alta ($n = 7$) e baixa ingestão de matéria seca ($n = 6$); e novilhas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à dieta de alta ($n = 7$) e baixa ingestão de matéria seca ($n = 7$).



Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

Na avaliação dos genes da família das aldo-keto-reductases, independente do protocolo de fornecimento de dieta (raça * dieta, $P > 0,05$), verificou-se maior abundância de transcritos para novilhas Holandesas, comparadas às novilhas Nelore, tanto para gene *AKR1D1* ($P = 0,002$), como para o gene *AKR1C4* ($P < 0,0001$; figura 20). Para estes genes, também foi observado efeito de dieta. A abundância de transcritos para o gene *AKR1D1* foi maior ($P = 0,005$) em novilhas submetidas à alta, comparada às novilhas submetidas à baixa ingestão de matéria seca/energia (figura 20). No entanto, foi observada menor abundância de transcritos ($P = 0,01$) para o gene *AKR1C4* em novilhas submetidas à alta que as submetidas à baixa ingestão de matéria seca/energia.

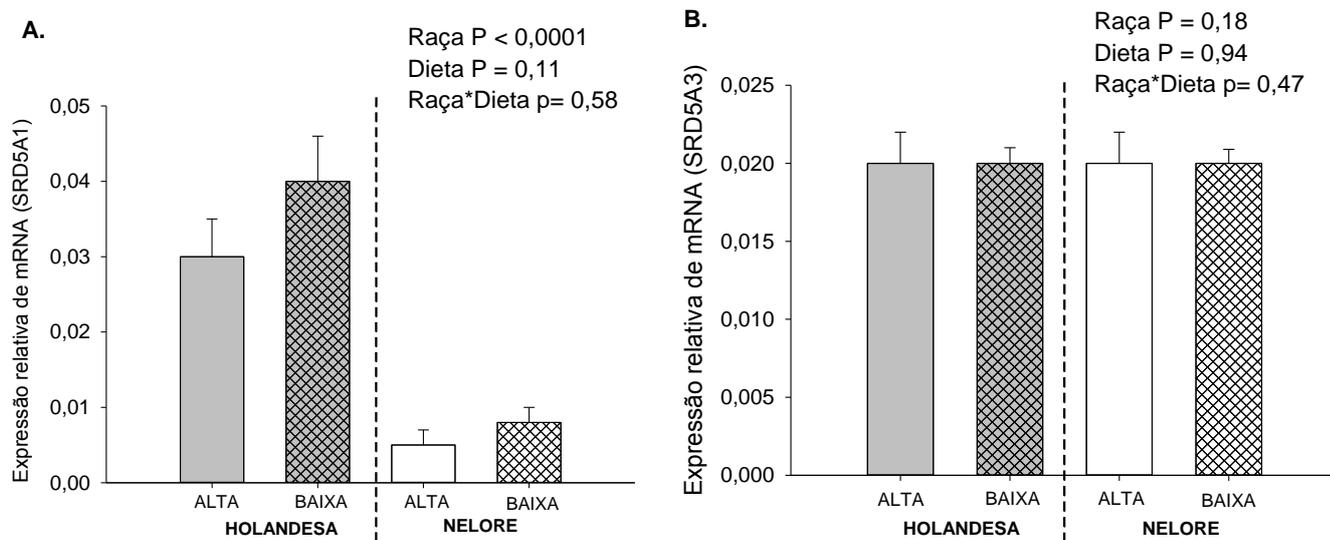
Figura 20. Expressão relativa de mRNA de *AKR1D1* (aldo – keto – reductase família 1, membro D1), e *AKR1C4* (aldo – keto – reductase família 1, membro C4) em novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à dieta de alta ($n = 7$) e baixa ingestão de matéria seca ($n = 6$); e novilhas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à dieta de alta ($n = 7$) e baixa ingestão de matéria seca ($n = 7$).



Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

Em relação às outras redutases (*SRD5A1* e *SRD5A3*), foi observada maior abundância de transcritos ($P < 0,0001$) para o gene *SRD5A1* em novilhas Holandesas comparadas às novilhas da raça Nelore. No entanto, para o gene *SRD5A3* não foi observado efeito de raça ($P = 0,11$; figura 21). Para ambos os genes não foi observado efeito de dieta (figura 21).

Figura 21 Expressão relativa de mRNA de *SRD5A1* e *SRD5A3* em novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*) submetidas à dieta de alta ($n = 7$) e baixa ingestão de matéria seca ($n = 6$); e novilhas Nelore submetidas à dieta de alta ($n = 7$) e baixa ingestão de matéria seca ($n = 7$).



Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

11. DISCUSSÃO

O presente estudo forneceu evidências de que o protocolo de sincronização da ovulação utilizando CIDR[®] e BE pode sincronizar de forma eficiente a emergência da nova onda de crescimento folicular em novilhas *Bos indicus* e *Bos taurus*, como descrito anteriormente (COLAZO; KASTELIC; MAPLETOFT, 2003; CARVALHO et al., 2008). O momento da emergência da nova onda de crescimento folicular foi similar entre os grupos genéticos. Sabe-se que variações no dia da emergência da nova onda de crescimento folicular estão associadas não somente ao tipo de estrógeno empregado (COLAZO; KASTELIC; MAPLETOFT, 2003; MAPLETOFT et al., 2003), mas também com a dose utilizada, tanto para fêmeas *Bos indicus*, como para *Bos taurus* (BASTOS, 2012). O intervalo entre o início do protocolo de sincronização e a emergência da nova onda de crescimento folicular observada neste estudo foi similar a prévios relatos que utilizaram a mesma dose de estrógeno no início do protocolo hormonal (BURKE et al., 2001; CARVALHO et al., 2008; BASTOS, 2012)

No presente estudo, os diferentes protocolos de fornecimento de dieta também não influenciaram o intervalo entre a inserção do CIDR[®] e a emergência de uma nova onda de crescimento folicular. Poderia-se especular que, com a restrição da dieta, o grupo de baixa ingestão de matéria seca/energia apresentaria redução no metabolismo de esteroides hepático, e com isso, maiores concentrações circulantes de E2 durante o protocolo de sincronização. Desta forma, quanto maior as concentrações de E2 mais tardio seria o aumento das concentrações de FSH, o que resultaria no atraso da emergência da nova onda de crescimento folicular (BASTOS, 2012). Entretanto, neste estudo, como já citado acima, não foi observado efeito de dieta para início da emergência folicular. Provavelmente as variações nas concentrações de E2 no início do protocolo entre os grupos que receberam alta e baixa ingestão de matéria seca/energia não foram suficientes para influenciar essa variável. No entanto, as avaliações das concentrações plasmáticas de E2 não foram realizadas no presente estudo para concluir essa possível hipótese.

Como observado em outros estudos (ALVAREZ et al., 2000; BURATINI et al., 2000; CARVALHO et al., 2008; GIMENES et al., 2009; BASTOS et al.,

2010), apesar da similaridade do intervalo entre a inserção do CIDR[®] e o início da nova onda de crescimento folicular, o número de folículos no momento da emergência da onda de crescimento folicular foi maior para novilhas *Bos indicus* que *Bos taurus*. Acredita-se que a insulina, assim como o IGF-1 (ALVAREZ et al., 2000), sejam responsáveis pelo maior número de folículos recrutados em fêmeas zebuínas comparadas às taurinas. BASTOS (2012) observou maior concentração de insulina na fase estrogênica comparada à fase progesterônica do ciclo estral, tanto em vacas *Bos indicus*, como em vacas *Bos taurus*. Ainda, em ambas as fases foram observadas maior concentração de insulina para fêmeas *Bos indicus* que para fêmeas *Bos taurus*. Além disso, corroborando nossos resultados, foi observado maior número de folículos na emergência da onda de crescimento folicular em fêmeas *Bos indicus* que em fêmeas *Bos taurus* (BASTOS, 2012).

No presente estudo, a dieta oferecida poderia influenciar o número de folículos recrutados. Neste contexto, o aumento da ingestão de matéria seca/energia estaria associado ao aumento nas concentrações de insulina, o que poderia levar ao aumento do número de folículos recrutados (GUTIÉRREZ et al., 1997). No entanto, a alta ou a baixa ingestão de matéria seca/energia não influenciou o número de folículos recrutados no momento da emergência de nova onda de crescimento folicular. Corroborando esses dados, existem estudos prévios que não observaram diferença na população folicular com a manipulação da dieta (SALES, 2011; BASTOS, 2012).

Independente da alta ou baixa ingestão de matéria seca/energia, a taxa de crescimento folicular diária foi menor em novilhas *Bos indicus* que em novilhas *Bos taurus*. Além disso, novilhas *Bos indicus* apresentaram menor diâmetro do folículo dominante no dia 8 e 10, como também menor diâmetro máximo do folículo dominante após a retirada do dispositivo de P4 que novilhas *Bos taurus*. Ao se avaliar o diâmetro do folículo dominante ao longo do protocolo (da emergência até o folículo tornar-se dominante), foi observado que novilhas *Bos taurus* e novilhas submetidas à alta ingestão de matéria seca/energia apresentaram maior diâmetro folicular quando comparadas às novilhas *Bos indicus* e às novilhas submetidas à baixa ingestão de matéria seca/energia. Esta diferença foi observada a partir do dia seis do protocolo (D6), ou seja, provavelmente no período em que ocorreu a divergência folicular.

Em outros estudos, no momento da divergência também foi observado menor diâmetro folicular em fêmeas *Bos indicus* que fêmeas *Bos taurus* (SARTORELLI et al., 2005; GIMENES et al., 2008a; BASTOS et al., 2010).

Prévios estudos também relatam que fêmeas *Bos indicus* apresentam menor diâmetro do folículo dominante que fêmeas *Bos taurus* (CARVALHO et al., 2008; GIMENES et al., 2008b; BASTOS et al., 2010; SALES, 2011). É possível que o menor crescimento folicular das fêmeas *Bos indicus* seja devido à maior concentração de P4 durante o protocolo hormonal quando comparadas às fêmeas *Bos taurus*. A maior concentração de P4 pode suprimir a frequência de pulsos de LH (SANCHEZ et al., 1995; BERGFELD et al., 1996; BURKE; MACMILLAN; BOLAND, 1996; KINDER et al., 1996; FIKE et al., 2004; HATLER et al., 2008) e, desta forma, suprimir o crescimento folicular (STOCK; FORTUNE, 1993; CARVALHO et al., 2008; SALES et al., 2014), resultando em folículos de menor diâmetro em fêmeas *Bos indicus*. No entanto, independente da concentração de P4, uma possível hipótese é que fêmeas da raça Nelore apresentem folículos menores comparadas às fêmeas Holandesas, como uma característica inerente à raça.

Sabe-se que o tamanho do folículo ovulatório apresenta alta correlação com o tamanho do CL formado posteriormente (VASCONCELOS et al., 2001; SARTORI; ROSA; WILTBANK, 2002). Neste estudo, embora não tenha sido observada diferença no diâmetro do folículo ovulatório entre os grupos genéticos, foi observada diferença no diâmetro e volume do CL subsequente. Novilhas da raça Nelore apresentaram diâmetro e volume de CL menores que novilhas da raça Holandesa, como também observado em prévio estudo com ambos os grupos genéticos (BASTOS et al., 2010). Ainda, no presente estudo foi observada menor taxa de ovulação para novilhas da raça Nelore que para novilhas da raça Holandesa. Como foi descrito anteriormente, altas concentrações circulantes de P4 podem diminuir a pulsatilidade de LH (BERGFELD et al., 1996). Desta forma, provavelmente devido às altas concentrações de P4 durante o protocolo hormonal, novilhas da raça Nelore apresentaram inferiores taxa de crescimento e diâmetro do folículo dominante, comprometendo o crescimento folicular e refletindo em reduzida taxa de ovulação quando comparada às novilhas da raça Holandesa.

Em relação à dieta fornecida, novilhas submetidas à alta ingestão de matéria seca/energia apresentaram maior taxa de crescimento folicular que novilhas submetidas à baixa ingestão de matéria seca/energia, em concordância com outros estudos (ARMSTRONG et al., 2001; MOLLO et al., 2007; SARTORI; BARROS, 2011). Além disso, foi observado que novilhas submetidas à alta ingestão de matéria seca/energia apresentaram maior diâmetro folicular no dia oito, nove e dez do protocolo hormonal. A maior ingestão de alimento aumenta a concentração de ácidos graxos voláteis no rúmen. Um destes ácidos graxos é o ácido propiônico, principal precursor de glicose em ruminantes, capaz de estimular a secreção de insulina. Assim, possivelmente o maior consumo de energia aumentou os níveis de glicose, insulina e IGF-I (SANTOS; AMSTALDEN, 1998). O aumento nas concentrações de IGF-1 e insulina poderiam estimular o aumento da taxa de crescimento folicular, refletindo em maior diâmetro do folículo dominante em animais que recebem dietas com alta ingestão de matéria seca/energia (MURPHY et al., 1991; ARMSTRONG et al., 2001). Ainda, a maior ingestão de energia está associada ao aumento na liberação de LH induzida pelo hormônio hipotalâmico liberador de LH (LHRH; RANDEL; RHODES, 1980; RUTTER et al., 1983), favorecendo o crescimento folicular.

Ainda, a maior ingestão de matéria seca aumenta o volume de fluxo sanguíneo hepático, o que permite maior metabolização dos hormônios esteroides no fígado (SANGSRITAVONG et al., 2002; WILTBANK et al., 2006). Esses achados podem explicar a redução da concentração plasmática de P4 durante o protocolo de sincronização nas novilhas do presente estudo submetidas à alta ingestão de matéria seca. Reduzidas concentrações de P4 durante o protocolo de sincronização podem ter promovido aumento da pulsatilidade de LH e do crescimento do folículo dominante (CIPRIANO et al., 2011). No presente estudo foram realizadas coletas de sangue a cada 15 min por um período de 6 h para posterior avaliação da pulsatilidade de LH durante o dia 7 do protocolo hormonal. Embora ainda não tenhamos essas análises, é provável que a maior frequência na pulsatilidade de LH seja observada em fêmeas submetidas à alta, comparada à baixa ingestão de matéria seca/energia; e em fêmeas Holandesas, comparada às fêmeas da raça Nelore,

devido à menor concentração circulante de P4 durante o protocolo de sincronização observada nestes grupos.

Independente da dieta fornecida, após retirada do dispositivo de P4 novilhas da raça Holandesa apresentaram antecipadamente comportamento de estro comparadas às novilhas da raça Nelore. Resultados semelhantes foram observados em vacas de mesmas raças (BASTOS, 2012). O comportamento de estro ocorre quando há queda nas concentrações circulantes de P4 e aumento a nas concentrações de E2 (ALLRICH, 1994). Neste estudo, a concentração de P4 na retirada do dispositivo foi maior para novilhas Nelore. Esses achados podem justificar o atraso no comportamento de estro nas novilhas desta raça. Além disso, foi observado atraso no momento da ovulação após a retirada do CIDR[®] nas novilhas da raça Nelore. Esses resultados podem estar relacionados às maiores concentrações de P4 durante o protocolo de sincronização em novilhas da raça Nelore comparadas às novilhas Holandesas. Em prévio estudo, vacas tratadas com dois dispositivos intravaginais de P4 apresentaram altas concentrações de P4, o que acarretou em menor taxa de crescimento folicular, como também em atraso no pico de LH e ovulação após a remoção do dispositivo (STOCK; FORTUNE, 1993). Além disso, também foi verificado atraso no momento da ovulação em vacas Nelore sincronizadas com dispositivos novos, que promovem maiores concentrações circulantes de P4 durante o protocolo de sincronização, que com dispositivos utilizados previamente (CREPALDI et al., 2009). Verificou-se, também, que novilhas da raça Holandesa apresentaram maior diâmetro do folículo dominante ao final do protocolo de sincronização. Folículos maiores produzem maiores concentrações de E2 (IRELAND; ROCHE, 1982; KRUIP; DIELEMAN, 1985), que podem justificar a antecipação da manifestação do estro e da ovulação ao final do protocolo de sincronização em novilhas da raça Holandesa.

Neste estudo, um importante resultado observado foi que novilhas da raça Nelore apresentaram maior concentração plasmática de P4 durante o protocolo de sincronização, provavelmente devido a menor metabolização hepática de P4, quando comparadas às novilhas da raça Holandesa. Esse efeito foi mais evidente no início do protocolo de sincronização. Da mesma forma, quando foi avaliada a concentração plasmática de P4 no momento da

biópsia hepática, verificou-se que novilhas da raça Nelore submetidas à baixa ingestão de matéria seca/energia apresentaram aumento na concentração de P4 comparadas com novilhas da raça Nelore submetidas à alta ingestão de matéria seca/energia. Entretanto, esse efeito não foi verificado em novilhas Holandesas submetidas aos mesmos protocolos de fornecimento de dieta. Sabe-se que com o aumento da ingestão matéria seca há aumento do fluxo sanguíneo hepático e do metabolismo de esteroides no fígado (SANGSRITAVONG et al., 2002). No entanto, mesmo submetidas à baixa ingestão de matéria seca/energia, novilhas da raça Nelore apresentaram maior concentração de P4 que novilhas Holandesas. Desta forma, como também discutido por (BASTOS, 2012) uma hipótese plausível é que o metabolismo hepático de esteroides é mais lento em fêmeas da raça Nelore como característica inerente à raça, e não apenas como efeito da ingestão de matéria seca.

Sabe-se que existem duas possíveis vias de metabolismo hepático de P4, uma envolvendo reações de monoxigenação e/ou hidroxilação que envolvem enzimas da família citocromo P450, e outra via que cataboliza P4 através de reações de redução, envolvendo enzimas 5 α e 5 β redutases. Em relação às enzimas da família citocromo P450, não foi observado efeito de dieta para nenhum dos genes que codificam enzimas desta família. No presente estudo, foram particularmente avaliados os genes *CYP3A4* e *CYP2C19*. Corroborando nossos resultados, MATTOS et al., 2012 não observaram diferença na expressão de mRNA de *CYP2C* e *CYP3A* após ingestão alimentar em ovelhas submetidas à dieta *ad libitum* e restrita. No entanto, LEMLEY et al. (2008) observaram que a insulina altera a expressão das enzimas *CYP3A* e *CYP2C* em vacas leiteiras. Diferentemente de MATTOS et al., 2012, a biópsia hepática no presente estudo foi realizada em período pré-prandial, no qual possivelmente há baixas concentrações circulantes de insulina. Portanto, tanto em período com possível aumento ou não de insulina, a expressão de enzimas da família citocromo P450 não foi alterada. Desta forma, não está totalmente definido se o aumento nas concentrações de insulina *in vivo* causado pela maior ingestão de matéria seca e/ou energia é suficiente para reduzir a expressão de enzimas hepáticas relacionadas ao metabolismo de P4.

Ainda, um aspecto importante em relação a estes estudos sobre a expressão e atividade de enzimas envolvidas no metabolismo hepático de P4 é que alguns trabalhos se basearam no cultivo de hepatócitos *in vitro* (MURRAY, 1991; MURRAY, 1992). Além disso, a maioria dos trabalhos realizados *in vivo* induziu aumento de insulina por meio de infusão de propilenoglicol ou insulina (LEMLEY et al., 2008; LEMLEY et al., 2008; VIEIRA et al., 2012), o que pode ter contribuído para a diferença nos resultados encontrados no presente estudo, comparado a estudos anteriores.

Ainda, em relação as enzimas da família citocromo P450, independente da dieta fornecida, foi observada maior expressão de mRNA para *CYP3A4* em novilhas da raça Nelore comparadas às novilhas Holandesas. No entanto, este foi o único gene mais expresso em novilhas da raça Nelore. Já em novilhas Holandesas foi observada maior abundância de transcritos para os genes envolvendo o caminho das 5 α e 5 β redutases, particularmente os genes *AKR1D1*, *AKR1C4*, *SRD5A1*. Baseado em estudos realizados com microsomas hepáticos ovinos, o caminho mais comum do metabolismo de P4 no fígado envolve a 6 β e 21 hidroxilação, realizado pelas enzimas *CYP3A4* e *CYP2C19*, respectivamente (MURRAY, 1991; MURRAY, 1992). Entretanto, a maioria dos metabólitos encontrados no sangue, urina e fezes são provenientes do metabolismo envolvendo as 5 α e 5 β redutases (STUPNICKI; WILLIAMS, 1968; CHANTILIS et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1997). Essas informações são indicativas de que este caminho possivelmente represente a principal via de metabolismo hepático de P4 *in vivo*, como revisado por (WILTBANK et al., 2012). Desta forma, embora exista um papel crítico do elevado fluxo sanguíneo hepático no aumento do metabolismo de esteroides no fígado (SANGSRITAVONG et al., 2002), os resultados deste estudo são indicativos de que a modulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo de P4 pode justificar as diferenças nas concentrações circulantes de P4 observadas entre fêmeas zebuínas e taurinas.

Há indícios de que com a maior ingestão de matéria seca ocorra maior expressão de enzimas hepáticas que metabolizam hormônios esteroides (FERRELL, 1991). Em concordância com estes resultados, no presente estudo foi observado maior abundância de transcritos para o gene *AKR1D1* em novilhas submetidas à alta ingestão, comparada às submetidas à baixa

ingestão de matéria seca/energia. No entanto, para o gene *AKR1C4* foi observado maior abundância de transcritos nas novilhas submetidas à baixa comparada à alta ingestão de matéria seca/energia. Estudos anteriores (HART et al., 2014) descrevem que diferenças na concentração de P4 seguida da restrição alimentar podem ser parcialmente moduladas pelas diferentes respostas na atividade enzimática da AKR1C. Esses achados são sugestivos de efeito de dieta na modulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo de P4.

Desta forma, os resultados apresentados são indicativos de que a modulação da expressão gênica de enzimas relacionadas ao metabolismo hepático de P4 é regulada pelo grupo genético e pela dieta.

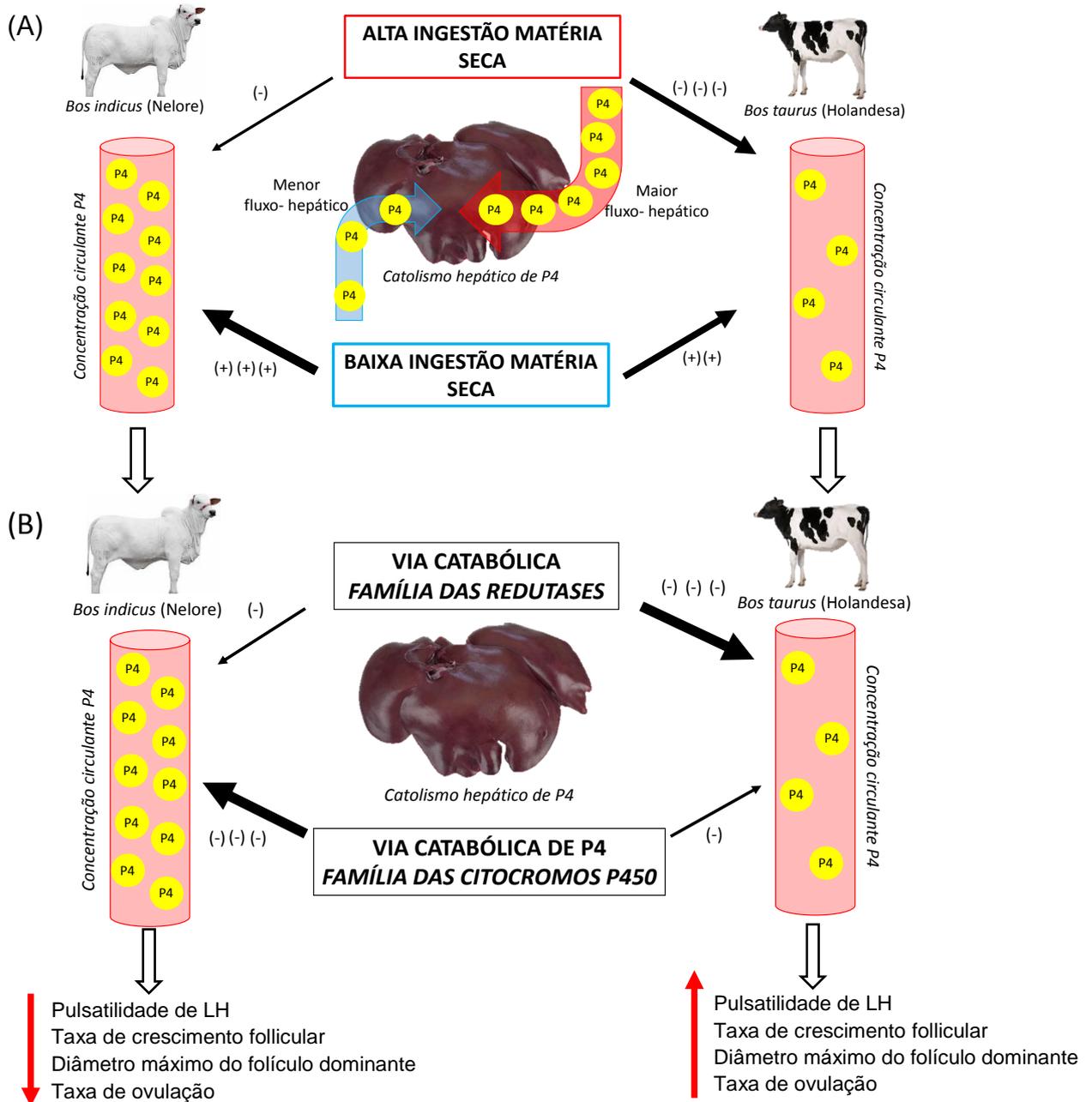
12 CONCLUSÃO

O efeito da dieta no perfil plasmático de P4 durante o protocolo de sincronização da ovulação comportou-se diferentemente conforme a raça. Verificou-se aumento mais evidente das concentrações plasmáticas de P4 durante o protocolo hormonal em novilhas Nelore submetidas à baixa ingestão de matéria seca que em novilhas Holandesas submetidas à mesma dieta.

Novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) apresentaram maiores concentrações plasmáticas de P4, menor taxa de crescimento do folículo dominante, menor diâmetro máximo do folículo dominante e do CL e menor taxa de ovulação ao final do protocolo de sincronização que novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*). Além disso, independentemente da raça avaliada, a alta ingestão de matéria seca/energia durante o protocolo de sincronização da ovulação resultou em menores concentrações plasmáticas de P4, maior taxa de crescimento folicular e maior diâmetro do folículo dominante e do corpo lúteo. Desta forma, estes resultados são indicativos de que existe efeito de raça e de ingestão de matéria seca no metabolismo hepático de P4, refletindo diretamente na resposta folicular ao protocolo de sincronização da ovulação.

Ainda, verificou-se efeito na modulação da expressão de enzimas hepáticas relacionados ao metabolismo de P4 conforme os grupos genéticos e a dieta fornecida. Foi observada maior expressão de enzimas hepáticas relacionadas ao metabolismo de P4 em novilhas da raça Holandesas que em novilhas da raça Nelore. Ainda, os genes mais expressos em novilhas da raça Nelore estão envolvidos em diferentes vias de catabolismo de P4 no fígado, quando comparados aos genes mais expressos em novilhas Holandesas. Assim, os dados são indicativos de que a menor metabolização hepática de P4 em novilhas da raça Nelore possa ser uma característica inerente à raça, e não somente ao consumo de matéria seca.

Figura 22. Modelo hipotético gráfico de fatores envolvidos no metabolismo de progesterona (P4) em novilhas *Bos indicus* (Nelore) e *Bos taurus* (Holandesa) durante protocolo de sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de P4.



Fonte: Batista, E.O.S. (2015)

Legenda: **(A)** Novilhas *Bos indicus* (Nelore) e *Bos taurus* (Holandesa) submetidas à alta ingestão de matéria seca demonstram maior fluxo sanguíneo hepático, o que resulta em maior catabolismo de P4 no fígado. Com a baixa ingestão de matéria seca há menor fluxo sanguíneo hepático, o que resulta em menor catabolismo de P4. No entanto, esta diferença do efeito da alta e baixa ingestão de matéria seca na concentração circulante de P4 durante protocolo para sincronização da ovulação com P4 parece ser mais pronunciada em novilhas Nelore. Há também o efeito das enzimas hepáticas envolvidas no catabolismo de P4 **(B)** que também contribuem para as diferentes concentrações circulantes de P4 que se observa entre ambos os grupos genéticos, o que resultará em diferentes respostas ao protocolo para IATF.

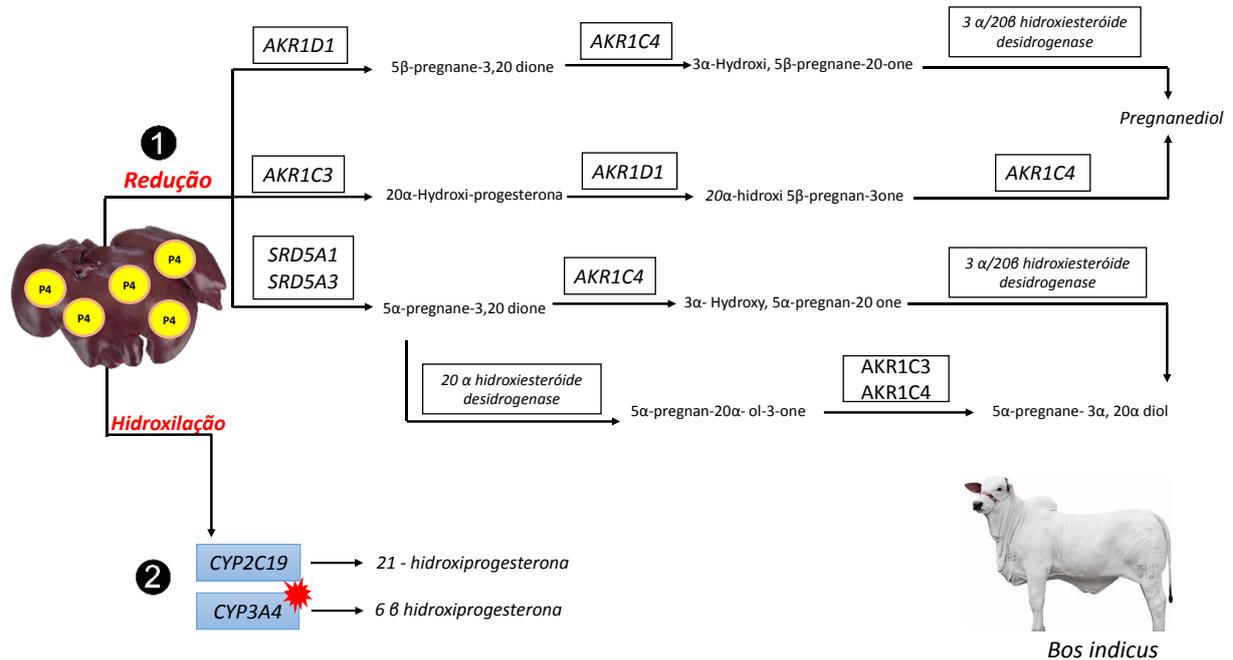
13. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo colaboram para maior compreensão dos fatores envolvidos com a metabolização de P4 e na resposta folicular ao tratamento de sincronização da ovulação em fêmeas zebuínas e taurinas. Novilhas da raça Nelore apresentaram maiores concentrações circulantes de P4 durante o protocolo de sincronização. Além disso, os efeitos de dieta foram mais pronunciados nas novilhas da raça Nelore. A baixa ingestão de matéria seca/energia promoveu maior aumento nas concentrações plasmáticas de P4 em novilhas da raça Nelore durante o protocolo de sincronização, comparado às novilhas da raça Holandesa. Esses resultados podem justificar, em parte, a resposta folicular ao protocolo de sincronização e a reduzida taxa de concepção à IATF frequentemente observada em novilhas Nelore durante a estação reprodutiva.

Desta forma, em novilhas da raça Nelore, a utilização de dispositivos intravaginais que contém baixa concentração de P4 é indicada para evitar comprometimento no crescimento folicular e resposta ao protocolo de sincronização. Ainda, o fornecimento adequado de matéria seca/energia durante a estação reprodutiva pode colaborar na redução das concentrações plasmáticas de P4, melhorando a resposta folicular ao protocolo de sincronização da ovulação. Além disso, o uso da $PGF_2\alpha$ no início do protocolo de sincronização promove lise do CL e assim pode reduzir os efeitos negativos da P4 no crescimento folicular.

De forma inédita, os resultados do presente estudo demonstraram diferença na regulação da expressão gênica de enzimas envolvidas com o metabolismo de hepático de P4 entre novilhas da raça Holandesa e Nelore, independente da dieta fornecida (figura 22 e 23). Essas informações são úteis para o entendimento das possíveis diferenças de respostas aos protocolos de sincronização que empregam esteroides, e podem contribuir para futuras pesquisas que procuram melhorar a eficiência da sincronização da ovulação nos diferentes grupos genéticos.

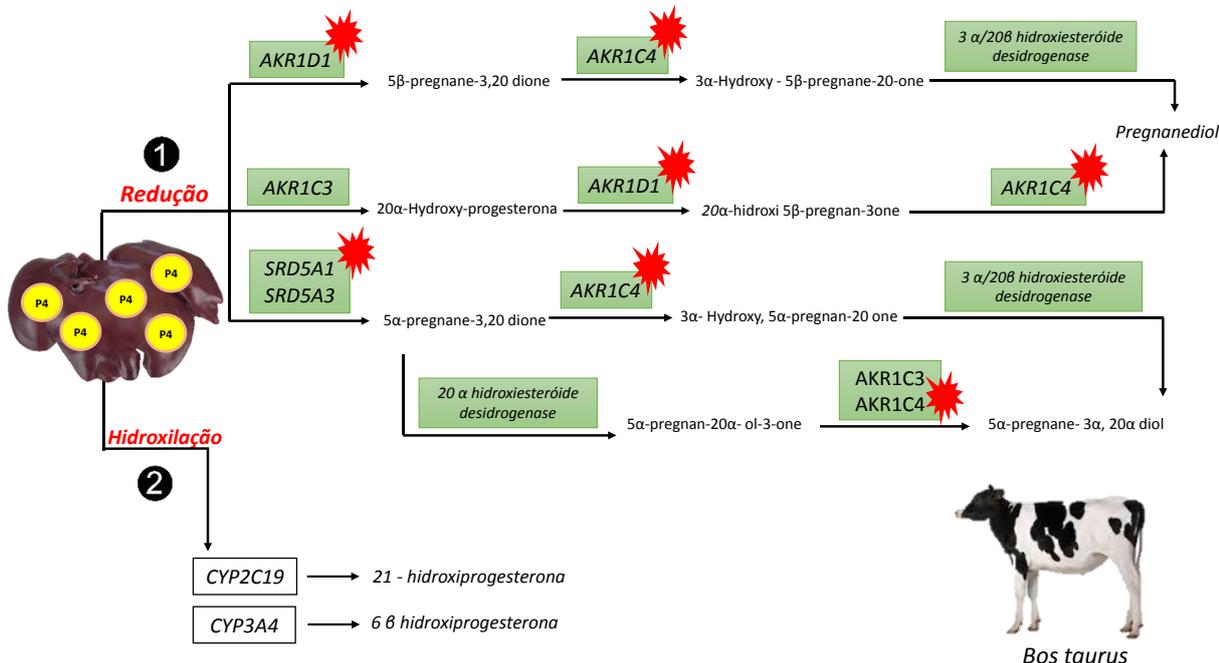
Figura 23. Modelo hipotético das enzimas envolvidas na primeira fase do metabolismo hepático de progesterona (P4) em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*), independente da dieta fornecida



Fonte: Fonte: Batista, E.O.S. (2015). Adaptado de Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: Steroid Hormone Biosynthesis. Disponível em: <http://www.kegg.jp>. Acesso em: 31 ago.2015.

Legenda: Nos hepatócitos, a progesterona (P4) pode ser catabolizada por dois principais caminhos metabólicos, um envolvendo reações de redução (1) pelas enzimas 5 - alpha (SRD5A1, SRD5A3, AKR1C4, AKR1C3) e 5 - beta redutases (AKR1D1) e outro envolvendo reações de hidroxilação (2) (...) pelas enzimas da família citocromo P450, no modelo representado pela CYP2C19 e CYP3A4. Ambas as reações resultam em metabólitos hidrofílicos. Em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*), independente da dieta fornecida (alta ou baixa ingestão de matéria seca), o caminho envolvendo reações de hidroxilação, particularmente com uma maior abundância de transcritos para o gene CYP3A4 (☀) foi observado no presente estudo

Figura 24. Modelo hipotético das enzimas envolvidas na primeira fase do metabolismo hepático de progesterona (P4) em novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*), independente da dieta fornecida.



Fonte: Fonte: Batista, E.O.S. (2015). Adaptado de Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: Steroid Hormone Biosynthesis. Disponível em: <http://www.kegg.jp>. Acesso em: 31 ago.2015.

Legenda: Nos hepatócitos, a progesterona (P4) pode ser catabolizada por dois principais caminhos metabólicos, um envolvendo reações de redução (1) pelas enzimas 5 - alpha (SRD5A1, SRD5A3, AKR1C4, AKR1C3) e 5 - beta redutases (AKR1D1), e outro envolvendo reações de hidroxilação (2) (...) pelas enzimas da família citocromo P450, no modelo representado pela CYP2C19 e CYP3A4. Ambas as reações resultam em metabólitos hidrofílicos. Em novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*), independente da dieta fornecida (alta ou baixa ingestão de matéria seca), o caminho envolvendo reações de redução, particularmente com uma maior abundância de transcritos para o gene AKR1D1, SRD5A1, AKR1C4 (*) foi observado no presente estudo

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 113-120, 1995.
- ADLERCREUTZ, H.; MARTIN, F. Biliary excretion and intestinal metabolism of progesterone and estrogens in man. **Journal of steroid biochemistry**, v. 13, n. 2, p. 231-244, 1980.
- AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 1, p. 180-187, 2010.
- ALLRICH, R. D. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 77, n. 9, p. 2738-2744, 1994.
- ALVAREZ, P.; SPICER, L. J.; CHASE, C. C.; PAYTON, M. E.; HAMILTON, T. D.; STEWART, R. E.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; WETTEMANN, R. P. 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.
- ARMSTRONG, D. G.; MCEVOY, T. G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J. J.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Effect of Dietary Energy and Protein on Bovine Follicular Dynamics and Embryo Production In Vitro: Associations with the Ovarian Insulin-Like Growth Factor System. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1624-1632, 2001.
- BAO, B.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; SALFEN, B. E.; YOUNGQUIST, R. S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of reproduction**, v. 56, n. 5, p. 1158-1168, 1997.
- BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1483-1496, 2001.
- BARUSELLI, P.; SALES, J.; SALA, R.; VIEIRA, L.; FILHO, M. S. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal reproduction**, v. 9, n. 3, p. 139-152, 2012.
- BARUSELLI, P. S. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. **Revista brasileira de reprodução animal**, v. 26, n. 3, p. 218-222, 2002.
- BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Reproductive physiology of *Bos taurus* and *Bos indicus* females. **Revista brasileira de reprodução animal**, v. 31, n. 2, p. 6, 2007.
- BASTOS, M. R.; MATTOS, M. C. C.; MESCHIATTI, M. A. P.; SURJUS, R. S.; GUARDIEIRO, M. M.; FERREIRA, J. C. P.; MOURÃO, G. B.; PIRES, A. V.; BIEHL, M. V.; PEDROSO, A. M.; SANTOS, F. A. P.; SARTORI, R. Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. **Acta scientiae veterinariae**, v. 38, n.11, p. 776, 2010.

BASTOS, M. R. **Diferenças Fisiológicas e Reprodutivas entre *Bos taurus* e *Bos indicus***. 2012. 145 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo, 2012.

BATISTA, E. O. S.; MACEDO, G. G.; SALA, R. V.; ORTOLAN, M.; SÁ FILHO, M. F.; DEL VALLE, T. A.; JESUS, E. F.; LOPES, R.; RENNÓ, F. P.; BARUSELLI, P. S. Plasma Antimüllerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers. **Reproduction in domestic animals**, v. 49, n. 3, p. 448-452, 2014.

BATISTA, E. O. S.; GUERREIRO, B. M.; FREITAS, B. G.; SILVA, J. C. B.; VIEIRA, L. M.; FERREIRA, R. M.; REZENDE, R. G.; BASSO, A. C.; LOPES, R. N. V. R.; RENNÓ, F. P.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Plasma anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker to select *Bos taurus* (Holstein) and *Bos indicus* (Nelore) calves for in vitro embryo production. **Domestic animal endocrinology**, v. 54, n. 1, p. 1-9, 2016.

BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicular-Fluid Factors and Granulosa-Cell Gene Expression Associated with Follicle Deviation in Cattle. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 2, p. 432-441, 2001.

BERGFELD, E. G.; KOJIMA, F. N.; CUPP, A. S.; WEHRMAN, M. E.; PETERS, K. E.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; KINDER, J. E. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 beta-estradiol in bovine females. **Biology of reproduction**, v. 54, n. 3, p. 546-553, 1996.

BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R. B.; XU, X. P.; KING, W. A. Potencial genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro* **Journal reproduction fertility supplement**, v. 38, n. 1, p. 87-98, 1989.

BINELLI, M.; MURPHY, B. D. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. **Reproduction, fertility and development**, v. 22, n. 1, p. 1-12, 2009.

BLEACH, E. C. L. Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrous cycles. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 621-629, 2004.

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRIBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555-1569, 1994.

BÓ, G. A.; CUTAIA, L.; BROGLIATTI, G. M. Programas de inseminación artificial a tempo fijo em ganado bovino utilizando progestagenos y estradiol. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal, 1., 2001, Córdoba, **Anais.....** Córdoba: IRAC, 2001. p. 117 – 136.

BÓ, G. A.; CUTAIA, L.; TRIBULO, H. E. Hormonal treatments for fixed-time artificial insemination: some experiments performed in Argentina **Taurus**, v. 15, n. 1, p. 17-32, 2002.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3-4, p. 307-326, 2003.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MAPLETOFT, R. J. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. **Animal reproduction**, v. 10, n. 1, p. 137-142, 2013.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Animal**, v. 8, n. 1, p. 144-150, 2014.

BOSSIS, I.; WETTEMANN, R. P.; WELTY, S. D.; VIZCARRA, J. A.; SPICER, L. J.; DISKIN, M. G. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. **Journal of animal science**, v. 77, n. 6, p. 1536-1546, 1999.

BOSSIS, I.; WETTEMANN, R. P.; WELTY, S. D.; VIZCARRA, J.; SPICER, L. J. Nutritionally Induced Anovulation in Beef Heifers: Ovarian and Endocrine Function During Realimentation and Resumption of Ovulation. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1436-1444, 2000.

BRIDGES, G. A.; MUSSARD, M. L.; PATE, J. L.; OTT, T. L.; HANSEN, T. R.; DAY, M. L. Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. **Animal reproduction science**, v. 133, n. 1, p. 16-26, 2012.

BURATINI JR, J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BÓ, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, n. 3, p. 421-431, 2000.

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. 1-2, p. 13-28, 1996.

BURKE, C. R.; MUSSARD, M. L.; GRUM, D. E.; DAY, M. L. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. **Animal reproduction science**, v. 66, n. 3, p. 161-174, 2001.

CAHILL, L. P.; MARIANA, J. C.; MAULÉON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **Journal of reproduction and fertility**, v. 55, n. 1, p. 27-36, 1979.

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus*×*Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 167-175, 2008.

CASTILHO, C. **Divergência no crescimento folicular e sua influência sobre a competência oocitária para o desenvolvimento embrionário *in vitro* em novilhas da raça Nelore**. 2003. 90 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" Jaboticabal, 2003.

CATE, R. L.; MATTALIANO, R. J.; HESSION, C.; TIZARD, R.; FARBER, N. M.; CHEUNG, A.; NINFA, E. G.; FREY, A. Z.; GASH, D. J.; CHOW, E. P.; FISHER, R. A.; BERTONIS, J. M.; TORRES, G.; WALLNER, B. P.; RAMACHANDRAN, K. L.; RAGIN, R. C.; MANGANARO, T. F.; MACLAUGHLIN, D. T.; DONAHOE, P. K. Isolation of the bovine and human genes for müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. **Cell**, v. 45, n. 5, p. 685-698, 1986.

CERRI, R. L. A.; RUTIGLIANO, H. M.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. **Reproduction**, v. 137, n. 5, p. 813-823, 2009.

CHAFFIN, C.; DISSEN, G.; STOUFFER, R. Hormonal regulation of steroidogenic enzyme expression in granulosa cells during the peri-ovulatory interval in monkeys. **Molecular human reproduction**, v. 6, n. 1, p. 11-18, 2000.

CHANTILIS, S.; DOMBROSKI, R.; SHACKLETON, C.; CASEY, M.; MACDONALD, P. Metabolism of 5 alpha-dihydroprogesterone in women and men: 3 beta-and 3 alpha-, 6 alpha-dihydroxy-5 alpha-pregnan-20-ones are major urinary metabolites. **The journal of clinical endocrinology & metabolism**, v. 81, n. 10, p. 3644-3649, 1996.

CIPRIANO, R. S.; CARVALHO, B. A.; MARANGONI, N. R.; NOGUEIRA, G. P. LH and FSH concentration and follicular development in Nelore heifers submitted to fixed-time artificial insemination protocols with different progesterone concentrations. **Animal reproduction science**, v. 127, n. 1-2, p. 16-22, 2011.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 855-865, 2003.

CREPALDI, G.A. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2009.

DAVIDGE, S.; WIEBOLD, J.; SENGER, P.; HILLERS, J. Influence of varying levels of blood progesterone upon estrous behavior in cattle. **Journal of animal science**, v. 64, n. 1, p. 126-132, 1987.

DE LA MATA, J. J.; BÓ, G. A. Estrus synchronization and ovulation using protocols with estradiol benzoate and GnRH and reduced periods of insertion of a progesterone releasing device in beef heifers. **Taurus**, v. 55, p. 17-23, 2012.

DE SILVA, A. W. M. V.; ANDERSON, G. W.; GWAZDAUSKAS, F. C.; MCGILLIARD, M. L.; LINEWEAVER, J. A. Interrelationships With Estrous Behavior and Conception in Dairy Cattle. **Journal of dairy science**, v. 64, n. 12, p. 2409-2418, 1981.

DIAS, C.; WECHSLER, F.; DAY, M.; VASCONCELOS, J. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F2 α treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 72, n. 3, p. 378-385, 2009.

DISKIN, M. G.; MACKEY, D. R.; ROCHE, J. F.; SREENAN, J. M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3-4, p. 345-370, 2003.

DOMÍNGUEZ, M. M. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. **Theriogenology**, v. 43, n. 8, p. 1405-1418, 1995.

ERICKSON, B. H. Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary. **Journal of animal science**, v. 25, n. 3, p. 800-805, 1966a.

ERICKSON, B. H. DEVELOPMENT AND RADIO-RESPONSE OF THE PRENATAL BOVINE OVARY. **Journal of reproduction and fertility**, v. 11, n. 1, p. 97-105, 1966b.

ERICKSON, B. H.; REYNOLDS, R. A.; MURPHREE, R. L. Ovarian Characteristics and Reproductive Performance of the Aged Cow. **Biology of reproduction**, v. 15, n. 4, p. 555-560, 1976.

EVANS, A. C. O.; FORTUNE, J. E. Selection of the Dominant Follicle in Cattle Occurs in the Absence of Differences in the Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin Receptors. **Endocrinology**, v. 138, n. 7, p. 2963-2971, 1997.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3, p. 203-216, 2003.

FAJERSSON, P.; BARRADAS, H. V.; ROMAN-PONCE, H.; COOK, R. M. The effects of dietary protein on age and weight at the onset of puberty in Brown Swiss and Zebu heifers in the tropics. **Theriogenology**, v. 35, n. 4, p. 845-855, 1991.

FERRELL, C. L. Nutritional influences on reproduction In: CUPPS, P.T. (Ed.) *Reproduction Domestic Animals*, v. 4, 1991, London. **Anais.....** London: Academic Press Inc, 1991, p. 577-604, 1991.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.

FIKE, K. E.; KOJIMA, F. N.; LINDSEY, B. R.; BERGFELD, E. G. M.; QUINTAL-FRANCO, J. A.; MELVIN, E. J.; ZANELLA, E. L.; WEHRMAN, M. E.; KINDER, J. E. Regulation of frequency of luteinizing hormone pulses by magnitude of acute change in circulating concentration of progesterone of female cattle. **Animal reproduction science**, v. 84, n. 3-4, p. 279-291, 2004.

FORTUNE, J.; QUIRK, S. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. **Journal of animal science**, v. 66, n. 2, p. 1-8, 1988.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M. Differentiation of Dominant Versus Subordinate Follicles in Cattle. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 3, p. 648-654, 2001.

FRERET, S.; GRIMARD, B.; PONTER, A. A.; JOLY, C.; PONSART, C.; HUMBLLOT, P. Reduction of body-weight gain enhances in vitro embryo production in overfed superovulated dairy heifers. **Reproduction**, v. 131, n. 4, p. 783-794, 2006.

GAMBINI, A. L. G.; MOREIRA, M. B. P.; CASTILHO, C.; BARROS, C. M. Follicular development and synchronization of ovulation in Gir cows. **Revista brasileira de reprodução animal**, v. 22, p. 201-210, 1998.

GIMENES, L. U.; SA, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES, J. R. S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 852-858, 2008a.

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 852-858, 2008b.

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES JÚNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicular dynamics of *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* heifers treated with norgestomet ear implant associated or not to injectable progesterone. **Animal reproduction**, v. 6, p. 256, 2009.

GIMENES, L. U. **Taxa de recuperação *in vivo* e competência *in vitro* de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular**. 2010. 122f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.

GINTHER, O.; BERGFELT, D.; BEG, M.; KOT, K. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Reproduction**, v. 124, n. 4, p. 475-482, 2002.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of reproduction and fertility**, v. 87, n. 1, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; KULICK, L. J.; WILTBANK, M. C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, n. 1, p. 75-87, 1997.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of fsh concentrations. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1079-1093, 1999.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal reproduction science**, v. 60–61, p. 61-79, 2000.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle Selection in Cattle: Role of Luteinizing Hormone. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 1, p. 197-205, 2001.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle Selection in Cattle: Relationships among Growth Rate, Diameter Ranking, and Capacity for Dominance. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 2, p. 345-350, 2001.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3-4, p. 239-257, 2003.

GONG, J.; LEE, W.; GARNSWORTHY, P.; WEBB, R. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 419-427, 2002.

GUERREIRO, B.; BATISTA, E.; VIEIRA, L.; SÁ FILHO, M.; RODRIGUES, C.; NETTO, A. C.; SILVEIRA, C.; BAYEUX, B.; DIAS, E.; MONTEIRO, F. Plasma anti-Mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Domestic animal endocrinology**, v. 49, p.96 - 104, 2014.

GUTIÉRREZ, C. G.; OLDHAM, J.; BRAMLEY, T. A.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. **Journal of animal science**, v. 75, n. 7, p. 1876-1884, 1997.

HART, C.; CAMACHO, L.; SWANSON, K.; VONNAHME, K.; LEMLEY, C. Hepatic steroid metabolizing enzyme activity during early, mid, and late bovine pregnancy. **Domestic animal endocrinology**, v. 49, p. 31-38, 2014.

HATLER, T. B.; HAYES, S. H.; RAY, D. L.; REAMES, P. S.; SILVIA, W. J. Effect of subluteal concentrations of progesterone on luteinizing hormone and ovulation in lactating dairy cows. **The veterinary journal**, v. 177, n. 3, p. 360-368, 2008.

HAWK, H. W.; COOPER, B. S. Improvement of Sperm Transport by the Administration of Estradiol to Estrous Ewes. **Journal of animal science**, v. 41, n. 5, p. 1400-1406, 1975.

HOYER, P.; NISWENDER, G. The regulation of steroidogenesis is different in the two types of ovine luteal cells. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 240-248, 1985.

HOYER, P.; NISWENDER, G. Adenosine 3', 5'-Monophosphate-Binding Capacity in Small and Large Ovine Luteal Cells*. **Endocrinology**, v. 119, n. 4, p. 1822-1829, 1986.

HOYER, P.; KONG, W.; CRICHTON, E.; BEVAN, L.; KRUTZSCH, P. Steroidogenic capacity and ultrastructural morphology of cultured ovine luteal cells. **Biology of reproduction**, v. 38, n. 4, p. 909-920, 1988.

IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Development of Antral Follicles in Cattle after Prostaglandin-Induced Luteolysis: Changes in Serum Hormones, Steroids in Follicular Fluid, and Gonadotropin Receptors. **Endocrinology**, v. 111, n. 6, p. 2077-2086, 1982.

IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A. P. N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1219-1225, 2008.

KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1269-1278, 1990.

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.

KINDER, J. E.; KOJIMA, F. N.; BERGFELD, E. G.; WEHRMAN, M. E.; FIKE, K. E. Progesterin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of animal science**, v. 74, n. 6, p. 1424-1440, 1996.

KOMAR, C. M.; BERNDTSON, A. K.; EVANS, A. C. O.; FORTUNE, J. E. Decline in Circulating Estradiol During the Periovulatory Period Is Correlated with Decreases in Estradiol and Androgen, and in Messenger RNA for P450 Aromatase and P450 17 α -Hydroxylase, in Bovine Preovulatory Follicles. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1797-1805, 2001.

KRUIP, T. A. M.; DIELEMAN, S. J. Steroid hormone concentrations in the fluid of bovine follicles relative to size, quality and stage of the oestrus cycle. **Theriogenology**, v. 24, n. 4, p. 395-408, 1985.

KULICK, L.; KOT, K.; WILTBANK, M.; GINTHER, O. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 913-921, 1999.

LAWRENCE, M. C.; MCKERN, N. M.; WARD, C. W. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. **Current opinion in structural biology**, v. 17, n. 6, p. 699-705, 2007.

LEIVA, T.; COOKE, R. F.; ABOIN, A. C.; SOARES, H. F.; BARBOSA, M.; MADUREIRA, A. M. L.; BORGES, M. A. F.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of propiogenic ingredients on serum concentration of insulin and progesterone in non-lactating cows. **Livestock science**, v. 153, n. 1-3, p. 165-172, 2013.

LEMLEY, C.; BUTLER, S.; BUTLER, W.; WILSON, M. Short communication: insulin alters hepatic progesterone catabolic enzymes cytochrome P450 2C and 3A in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 91, n. 2, p. 641-645, 2008.

LEMLEY, C. O.; KOCH, J. M.; BLEMINGS, K. P.; KRAUSE, K. M.; WILSON, M. E. Concomitant changes in progesterone catabolic enzymes, cytochrome P450 2C and 3A, with plasma insulin concentrations in ewes supplemented with sodium acetate or sodium propionate. **Animal**, v. 2, n. 8, p. 1223-1229, 2008.

LEMLEY, C. O.; WILMOTH, T. A.; TAGER, L. R.; KRAUSE, K. M.; WILSON, M. E. Effect of a high cornstarch diet on hepatic cytochrome P450 2C and 3A activity and progesterone half-life in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 3, p. 1012-1021, 2010a.

LEMLEY, C. O.; VONNAHME, K. A.; TAGER, L. R.; KRAUSE, K. M.; WILSON, M. E. Diet-induced alterations in hepatic progesterone (P4) catabolic enzyme activity and P4 clearance rate in lactating dairy cows. **Journal of endocrinology**, v. 205, n. 3, p. 233-241, 2010b.

LEROY, J.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part II Mechanisms Linking Nutrition and Reduced Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows. **Reproduction in domestic animals**, v. 43, n. 5, p. 623-632, 2008.

LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P. E. J.; DE KRUIF, A. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. **Animal reproduction science**, v. 80, n. 3-4, p. 201-211, 2004a.

LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P. E. J.; DEWULF, J.; DE KRUIF, A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1131-1143, 2004b.

LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal reproduction science**, v. 81, n. 3-4, p. 209-223, 2004.

LOPEZ, H. Reproductive Hormones and Follicular Growth During Development of One or Multiple Dominant Follicles in Cattle. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 4, p. 788-795, 2004.
LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of animal science**, v. 70, n. 11, p. 3615-3626, 1992.

LUCY, M. C. Estratégias de vacas leiteiras para melhoria dos índices reprodutivos durante o verão. In: V Curso "Novos Enfoques na produção e reprodução de bovinos", 2001, Uberlândia: **Anais...** Uberlândia: CONAPEC, 2001, p. 12-18.

MACABELLI, C. H.; FERREIRA, R. M.; GIMENES, L. U.; DE CARVALHO, N.; SOARES, J. G.; AYRES, H.; FERRAZ, M. L.; WATANABE, Y. F.; WATANABE, O. Y.; SANGALLI, J. R. Reference Gene Selection for Gene Expression Analysis of Oocytes Collected from Dairy Cattle and Buffaloes during Winter and Summer. **PLoS one**, v. 9, n. 3, p. 93287, 2014.

MACKEY, D. R.; SREENAN, J. M.; ROCHE, J. F.; DISKIN, M. G. Effect of Acute Nutritional Restriction on Incidence of Anovulation and Periovarian Estradiol and Gonadotropin Concentrations in Beef Heifers. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 6, p. 1601-1607, 1999.

MACKEY, D. R.; WYLIE, A. R.; SREENAN, J. M.; ROCHE, J. F.; DISKIN, M. G. The effect of acute nutritional change on follicle wave turnover, gonadotropin, and steroid concentration in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 78, n. 2, p. 429-442, 2000.

MACMILLAN, K. L.; PETERSON, A. J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. **Animal reproduction science**, v. 33, n. 1-4, p. 1-25, 1993.

MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. **Animal reproduction science**, v. 42, n. 1-4, p. 307-320, 1996.

MANTOVANI, A. P.; NICHI, M.; SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; VETTORATO, L. F.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Follicular growth and plasma progesterone patterns in *Bos indicus* x *Bos taurus* heifers submitted to different PGF₂alpha/progesterone-based synchronization protocols. **Animal reproduction**, v. 7, p. 91-96, 2010.

MAPLETOFT, R. J.; COLAZO, M. G.; MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P. Ésteres de estrógeno para lá sincronizacion de la emergencia de la onda follicular y la ovulacion en animales tratados com dispositivo de progesterona. In: 5 th Simposio Internacional de Reproducion Animal, 6., 2003, Cordoba. **Anais.... Córdoba: IRAC**, 2003, p. 55-67.

MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; ADAMS, G. P.; COOK, R. B.; OLSON, W. O.; MAPLETOFT, R. J. The use of progestins in regimens for fixed - timed artificial insemination in beef cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 1049-1059, 2002.

MARTINS, A. C.; MOLLO, M. R.; BASTOS, M. R.; GUARDIEIRO, M. M.; SARTORI, R. Concentrações séricas hormonais em vacas azebuadas submetidas à baixa e a alta ingestão alimentar **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.43, p.243-247, 2008.

MATTOS, F.C.S.Z. **Influência da ingestão alimentar nas concentrações plasmáticas de insulina e progesterona, e na expressão hepática de enzimas envolvidas no metabolismo de progesterona em ovelhas pré-púberes**. 2012. 45 f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2012.

MAZIERO, R. R. D.; MARTINS, A. C.; MOLLO, M. R.; MARTIN, I.; BASTOS, M. R.; FERREIRA, J. C. P.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Ovarian function in cows submitted to acute stress during proestrus. **Livestock science**, v. 138, n. 1-3, p.105-108, 2011.

MCCANN, J. P.; HANSEL, W. Relationships between insulin and glucose metabolism and pituitary-ovarian functions in fasted heifers. **Biology of reproduction**, v. 34, n. 4, p. 630-641, 1986.

MCCRACKEN, V. L.; XIE, G.; DEEVER, S. E.; BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P.; RHOADS, M. L. Short communication: Hepatic progesterone-metabolizing enzymes cytochrome P450 2C and 3A in lactating cows during thermoneutral and heat stress conditions¹. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 5, p. 3152-3157, 2015.

MILLER, H.; FOXCROFT, G.; SQUIRES, J.; AHERNE, F. The Effects of Feed Intake and Body Fatness on Progesterone Metabolism in Ovariectomized Gilts^{1, 2}. **Journal of animal science**, v. 77, p. 3253-3261, 1999.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*)**. 2003. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MOLLO, M. R.; RUMPF, R.; MARTINS, A. C.; MATTOS, M. C. C.; LOPES, J., G.; CARRIJO, L. H. D.; SARTORI, R. Ovarian function in Nelore heifers under low or high feed intake. **Acta scientiae veterinariae**, v. 35, p. 958, 2007.

MONNIAUX, D.; CLEMENTE, N. D.; TOUZÉ, J.-L.; BELVILLE, C.; RICO, C.; BONTOUX, M.; PICARD, J.-Y.; FABRE, S. Intrafollicular Steroids and Anti-Müllerian Hormone During Normal and Cystic Ovarian Follicular Development in the Cow. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 2, p. 387-396, 2008.

MORAN, C.; QUIRKE, J. F.; ROCHE, J. F. Puberty in heifers: A Review. **Animal reproduction science**, v. 18, n. 1-3, p. 167-182, 1989.

MORIEL, P.; SCATENA, T. S.; SA FILHO, O. G.; COOKE, R. F.; VASCONCELOS, J. L. Concentrations of progesterone and insulin in serum of nonlactating dairy cows in response to carbohydrate source and processing. **Journal of dairy science**, v. 91, n. 12, p. 4616-4621, 2008.

MURPHY, B. D. Models of luteinization. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 1, p. 2-11, 2000.

MURPHY, M. G.; ENRIGHT, W. J.; CROWE, M. A.; MCCONNELL, K.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. **Journal of reproduction and fertility**, v. 92, n. 2, p. 333-338, 1991.

MURRAY, M. Microsomal cytochrome P450-dependent steroid metabolism in male sheep liver. Quantitative importance of 6 β - hydroxylation and evidence for the involvement of a P450 from the IIIA subfamily in the pathway. **Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 38, p. 611-619, 1991.

MURRAY, M. Participation of a cytochrome P450 enzyme from the 2C subfamily in progesterone 21-hydroxylation in sheep liver. **The journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 6, p. 591-593, 1992.

NEBEL, R. L.; JOBST, S. M.; DRANSFIELD, M. G. Use of radiofrequency data communication system, Heat Watch, to describe behavioral estrus in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 80, n. 1, p. 151, 1997.

NISWENDER, G. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 333-339, 2002.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; MCGUIRE, W. J.; BELFIORE, C. J.; WILTBANK, M. C. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 2, p. 239-247, 1994.

NOGUEIRA, G. P. Puberty in South American *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Animal reproduction science**, v. 82-83, n. 0, p. 361-372, 2004.

O'SHEA, J.; RODGERS, R.; D'OCCHIO, M. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **Journal of reproduction and fertility**, v. 85, n. 2, p. 483-487, 1989.

ORIHUELA, P. A.; ORTIZ, M. E.; CROXATTO, H. B. Sperm Migration into and through the Oviduct Following Artificial Insemination at Different Stages of the Estrous Cycle in the Rat. **Biology of reproduction**, v. 60, n. 4, p. 908-913, 1999.

PARKINSON, T.; TURVEY, A.; JENNER, L. A morphometric analysis of the corpus luteum of the cow during the estrous cycle and early pregnancy. **Theriogenology**, v. 41, n. 5, p. 1115-1126, 1994.

PARR, R.; DAVIS, I.; MILES, M.; SQUIRES, T. Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. **Research in veterinary science**, v. 55, n. 3, p. 311-316, 1993.

PATE, J. L.; KEYES, P. L. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 665-676, 2001.

PENNING, T.; BURCZYNSKI, M.; JEZ, J.; HUNG, C.; LIN, H.; MA, H.; MOORE, M.; PALACKAL, N.; RATNAM, K. Human 3α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1–AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. **Biochemical journal**, v. 351, p. 67-77, 2000.

PENTEADO, L.; SÁ FILHO, M. F.; REIS, E. L.; TORRES JÚNIOR, J. R. S.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S. Eficiência reprodutiva em vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes submetidas a diferentes manejos durante a estação de monta. In: XVI reunião do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, v. 1, 2005, Belo Horizonte. **Anais....** Belo Horizonte: CBRA, 2005, p.105.

PERES, R. F. G.; JÚNIOR, I. C.; FILHO, O. G. S.; NOGUEIRA, G. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 72, n. 5, p. 681-689, 2009.

PERRY, G. A.; SWANSON, O. L.; LARIMORE, E. L.; PERRY, B. L.; DJIRA, G. D.; CUSHMAN, R. A. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. **Domestic animal endocrinology**, v. 48, p. 15-20, 2014.

PRATA, A. B. **Influência da alta ou baixa ingestão de matéria seca e/ou energia na produção in vitro de embriões bovinos**. 2013. 63 f. Dissertação (Mestre em Ciências), Faculdade Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba, 2013.

PRIME, G.; SYMONDS, H. Influence of plane of nutrition on portal blood flow and the metabolic clearance rate of progesterone in ovariectomized gilts. **The journal of agricultural science**, v. 121, n.3, p. 389-397, 1993.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

PURSLEY, R. J.; SILCOX, R. W.; WILTBANK, M. C. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 81, n. 8, p. 2139-2144, 1998.

RAE, D. O.; CHENOWETH, P. J.; GIANGRECO, M. A.; DIXON, P. W.; BENNETT, F. L. Assessment of estrus detection by visual observation and electronic detection methods and characterization of factors associated with estrus and pregnancy in beef heifers. **Theriogenology**, v. 51, n. 6, p. 1121-1132, 1999.

RANDEL, R. D. LH and ovulation in Brahman, Brahman x Hereford and Hereford heifers. **Journal of animal science**, v. 43, p. 300, 1976.

RANDEL, R. D.; RHODES, R. C. The Effect of Dietary Monensin on the Luteinizing Hormone Response of Prepuberal Heifers given a Multiple Gonadotropin-Releasing Hormone Challenge. **Journal of animal science**, v. 51, n. 4, p. 925-931, 1980.

RANDEL, R. D. Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). **Theriogenology**, v. 21, n. 1, p. 170-185, 1984.

RÉ, M.; DE LA MATA, J. J.; BÓ, G. A. Synchronization of ovulation in dairy heifers using a shortened estradiol-based protocol that provides for a lengthened proestrus. **Reproduction and fertility and development**, v. 26, p. 118, 2014.

RHODES, F. M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K. W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal reproduction science**, v. 38, n. 4, p. 265-277, 1995.

RHODES, F. M.; FITZPATRICK, L. A.; ENTWISTLE, K. W.; DE'ATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. **Journal of reproduction and fertility**, v. 104, n. 1, p. 41-49, 1995.

RHODES, F. M.; ENTWISTLE, K. W.; KINDER, J. E. Changes in ovarian function and gonadotropin secretion preceding the onset of nutritionally induced anoestrus in *Bos indicus* heifers. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1437-1443, 1996.

RICO, C.; FABRE, S.; MÉDIGUE, C.; CLEMENTE, N. D.; CLÉMENT, F.; BONTOUX, M.; TOUZÉ, J.-L.; DUPONT, M.; BRIANT, E.; RÉMY, B.; BECKERS, J.-F.; MONNIAUX, D. Anti-Müllerian Hormone Is an Endocrine Marker of Ovarian Gonadotropin-Responsive Follicles and Can Help to Predict Superovulatory Responses in the Cow. **Biology of reproduction**, v. 80, n. 1, p. 50-59, 2009.

ROBINSON, J. Prenatal programming of the female reproductive neuroendocrine system by androgens. **Reproduction**, v. 132, n. 4, p. 539-547, 2006.

RODGERS, R. Purification, morphology, and progesterone production and content of three cell types isolated from the corpus luteum of the sheep. **Australian journal of biological sciences**, v. 35, n. 4, p. 441-456, 1982.

RODGERS, R.; OSHEA, J.; BRUCE, N. Quantitation of cells in the ovine corpus-luteum. **Journal of anatomy**, v. 3, n. 8, p. 645-646, 1983.

RODGERS, R.; O'SHEA, J.; BRUCE, N. Morphometric analysis of the cellular composition of the ovine corpus luteum. **Journal of anatomy**, v. 138, n. 4, p. 757, 1984.

RODRIGUES, H. D.; KINDER, J. E.; FITZPATRICK, L. A. Estradiol Regulation of Luteinizing Hormone Secretion in Heifers of Two Breed Types That Reach Puberty at Different Ages. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 3, p. 603-609, 2002.

RODRIGUES, R. O.; TREVISANUTO, C.; COOKE, R. F.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of body weight loss on serum progesterone concentrations of non-lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 131-137, 2011.

ROY, S. K.; TREACY, B. J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fertility and sterility**, v. 59, n. 4, p. 783-790, 1993.

RUTTER, L. M.; RANDEL, R. D.; SCHELLING, G. T.; FORREST, D. W. Effect of Abomasal Infusion of Propionate on the GnRH-Induced Luteinizing Hormone Release in Prepuberal Heifers. **Journal of animal science**, v. 56, n. 5, p. 1167-1173, 1983.

SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; AYRES, H.; CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; BARUSELLI, P. S. Follicular dynamics in *Bos indicus* heifers treated with norgestomet implant or intravaginal progesterone releasing device. **Acta Scientifica Veterinarie**, v. 33, p. 266, 2005.

SÁ FILHO, M. F. D.; CRESPILO, A.; SANTOS, J.; PERRY, G.; BARUSELLI, P. S. 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, p. 23-30, 2010.

SALES, J. N. S. **Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus***. 2001. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2011.

SALES, J.N.S.; CARVALHO, J.B.P.; CREPALDI, G.A.; SOARES, J.G.; GIROTTO, R.W.; MAIO, J.R.G.; SOUZA, J.C.; BARUSELLI, P.S. Effect of circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time artificial insemination on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelore) beef cows. **Theriogenology**, v.83, p.1093 – 1100, 2014.

SANCHEZ, T.; WEHRMAN, M. E.; KOJIMA, F. N.; CUPP, A. S.; BERGFELD, E. G.; PETERS, K. E.; MARISCAL, V.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Dosage of the synthetic progestin, norgestomet, influences luteinizing hormone pulse frequency and endogenous secretion of 17 beta-estradiol in heifers. **Biology of reproduction**, v. 52, n. 2, p. 464-469, 1995.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D. K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L. E.; WILTBANK, M. C. High Feed Intake Increases Liver Blood Flow and Metabolism of Progesterone and Estradiol-17 β in Dairy Cattle. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 11, p. 2831-2842, 2002.

SANGSRITAVONG, S. **Studies of steroid metabolism in dairy cattle**. 2002. 201 f. Tese (Doutorado em Fisiologia - Dairy Science) - Universidade de Wisconsin, Madison, 2002.

SANTOS, J. E. P.; AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. **Arquivo faculdade veterinária UFRGS**, v. 26, n. 1, p. 19-79, 1998.

SANTOS, J. E. P. Efeito da nutrição na reprodução bovina. In: Congresso Brasileiro de Raças Zebuínas, v. 5, 1998, Uberaba. **Anais...** Minas Gerais: ABCZ, 1998, p. 24-75.

SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 88-97, 2008.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2382-2394, 2005.

SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. Follicular Deviation and Acquisition of Ovulatory Capacity in Bovine Follicles. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403-1409, 2001.

SARTORI, R.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Ovarian Structures and Circulating Steroids in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 11, p. 2813-2822, 2002.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.; SHAVER, R.; ROSA, G.; WILTBANK, M. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 4, p. 905-920, 2004.

SARTORI, R.; BASTOS, M. R.; BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; ERENO, R. L.; BARROS, C. M. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Society of reproduction fertility supplement**, v. 67, p. 357-375, 2010.

SARTORI, R.; BARROS, C. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 3, p. 244-250, 2011.

SATRAPA, R. A.; CASTILHO, A. S.; RAZZA, E. M.; PEGORER, M. F.; PUELKER, R.; BARROS, C. M. Differential expression of members of the IGF system in OPU-derived oocytes from Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) cows. **Animal reproduction science**, v. 138, n. 3-4, p. 155-158, 2013.

SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of reproduction and fertility**, v. 83, n. 2, p. 663-671, 1988.

SCHILLO, K. K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **Journal of animal science**, v. 70, n. 4, p. 1271-1282, 1992.

SCHWARZENBERGER, F.; PALME, R.; BAMBERG, E.; MÖSTL, E. A review of faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in mammals. **Zeitschrift fuer Saeugetierkunde**, v. 62, n. 2, p. 214 - 221, 1997.

SEGERSON, E. C.; HANSEN, T. R.; LIBBY, D. W.; RANDEL, R. D.; GETZ, W. R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of animal science**, v. 59, n. 4, p. 1026-1046, 1984.

SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M. G.; SILOTO, L. S.; HERTEL, M. F.; ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I. B.; STURION, L.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 6, p. 1051-1057, 2011.

SIMÕES, R. A. L.; SATRAPA, R. A.; ROSA, F. S.; PIAGENTINI, M.; CASTILHO, A. C. S.; ERENO, R. L.; TRINCA, L. A.; NOGUEIRA, M. F. G.; BURATINI, J.; BARROS, C. M. Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 139-147, 2012.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of reproduction**, v. 39, n. 2, p. 308-317, 1988.

SMITH, D.; STINEFELT, B.; BLEMINGS, K.; WILSON, M. Diet-induced alterations in progesterone clearance appear to be mediated by insulin signaling in hepatocytes. **Journal of animal science**, v. 84, n. 5, p. 1102-1109, 2006.

SMITH, P.; BRAW-TAL, R.; CORRIGAN, K.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; MCNATTY, K. P. Ontogeny of ovarian follicle development in Booroola sheep fetuses that are homozygous carriers or non-carriers of the *FecB* gene. **Journal of reproduction and fertility**, v. 100, n. 2, p. 485-490, 1994.

SOARES, J. G.; MARTINS, C. M.; CARVALHO, N. A. T.; NICACIO, A. C.; ABREU-SILVA, A. L.; CAMPOS FILHO, E. P.; TORRES JÚNIOR, J. R. S.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Timing of insemination using sex-sorted sperm in embryo production with *Bos indicus* and *Bos taurus* superovulated donors. **Animal reproduction science**, v. 127, n. 3-4, p. 148-153, 2011.

SOUZA, A. H.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; WILTBANK, M. C. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 70, n. 2, p. 208-215, 2008.

SPITZER, J. C.; NISWENDER, G. D.; SEIDEL, G. E.; WILTBANK, J. N. Fertilization and Blood Levels of Progesterone and LH in Beef Heifers on a Restricted Energy Diet. **Journal of animal science**, v. 46, n. 4, p. 1071-1077, 1978.

STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 1108-1114, 1993.

STUPNICKI, R.; WILLIAMS, K. I. H. Urinary metabolites of 4-14C-progesterone in the ewe. **Steroids**, v. 12, n. 5, p. 581-587, 1968.

SURJUS, R. S. **Produção de embriões e fisiologia ovariana em vacas Nelore sob diferentes níveis nutricionais**. 2013. 81 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

TAIT, J.; BURSTEIN, S. In vivo studies of steroid dynamics in man. **The hormones**, v. 5, n.1, p. 441-557, 1964.

TAKAHASHI, M.; HAYASHI, M.; MANGANARO, T. F.; DONAHOE, P. K. The ontogeny of mullerian inhibiting substance in granulosa cells of the bovine ovarian follicle. **Biology of reproduction**, v. 35, n. 2, p. 447-453, 1986.

TAYLOR, W. The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces. **Vitamins and hormones**, v. 29, p. 201-285, 1970.

VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 307-314, 2001.

VASCONCELOS, J. L. M.; SANGSRITAVONG, S.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 795-807, 2003.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Follicular dynamics in Zebu cattle. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 35, p. 2501-2509, 2000.

VIEIRA, F. V. R.; LOPES, C. N.; CAPPELOZZA, B. I.; SCARPA, A. B.; COOKE, R. F.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of intravenous glucose infusion and nutritional balance on serum concentrations of NEFA, glucose, insulin, and progesterone in non-lactating dairy cows. **Journal dairy science**, v. 93, p. 3047-3055, 2010.

VIEIRA, F. V. R.; COOKE, R. F.; ABOIN, A. C.; LIMA, P.; VASCONCELOS, J. L. M. Short communication: Acute but transient increase in serum insulin reduces messenger RNA expression of hepatic enzymes associated with progesterone catabolism in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 2, p. 1085-1089, 2012.

VIGIER, B.; PICARD, J. Y.; TRAN, D.; LEGEAI, L.; JOSSO, N. Production of Anti-Mullerian Hormone: Another Homology between Sertoli and Granulosa Cells. **Endocrinology**, v. 114, n. 4, p. 1315-1320, 1984.

VILLA-GODOY, A.; HUGHES, T. L.; EMERY, R. S.; ENRIGHT, W. J.; EALY, A. D.; ZINN, S. A.; FOGWELL, R. L. Energy balance and body condition influence luteal function in holstein heifers. **Domestic animal endocrinology**, v. 7, n. 2, p. 135-148, 1990.

VISSER, J. A.; DURLINGER, A. L. L.; PETERS, I. J. J.; VAN DEN HEUVEL, E. R.; ROSE, U. M.; KRAMER, P.; DE JONG, F. H.; THEMEN, A. P. N. Increased Oocyte Degeneration and Follicular Atresia during the Estrous Cycle in Anti-Müllerian Hormone Null Mice. **Endocrinology**, v. 148, n. 5, p. 2301-2308, 2007.

VOELZ, B.; CLINE, G.; HART, C.; LEMLEY, C.; LARSON, J. Effect of 2 corpora lutea on blood perfusion, peripheral progesterone, and hepatic steroid-inactivating enzymes in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 1, p. 288-294, 2015.

WALSH, S. W.; MEHTA, J. P.; MCGETTIGAN, P. A.; BROWNE, J. A.; FORDE, N.; ALIBRAHIM, R. M.; MULLIGAN, F. J.; LOFTUS, B.; CROWE, M. A.; MATTHEWS, D.; DISKIN, M.; MIHM, M.; EVANS, A. C. O. Effect of the metabolic environment at key stages of follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis. **Physiological genomics**, v. 44, n. 9, p. 504-517, 2012.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J.-G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **Journal of animal science**, v. 82, n. 13, 2004.

WILDMAN, E.; JONES, G.; WAGNER, P.; BOMAN, R.; TROUTT, H.; LESCH, T. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of dairy science**, v. 65, n. 3, p. 495-501, 1982.

WILTBANK, M.; BELFIORE, C.; NISWENDER, G. Steroidogenic enzyme activity after acute activation of protein kinase (PK) A and PKC in ovine small and large luteal cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 97, n. 1, p. 1-7, 1993.

WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GUMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 17-29, 2006.

WILTBANK, M.; SOUZA, A.; GIORDANO, J.; NASCIMENTO, A.; VASCONCELOS, J.; PEREIRA, M.; FRICKE, P.; SURJUS, R.; ZINSLY, F.; CARVALHO, P. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 231-241, 2012.

WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; BENDER, R. W.; NASCIMENTO, A. B. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. **Reproduction fertility development**, v. 24, n. 1, p. 238-243, 2011.

WOLFENSON, D.; INBAR, G.; ROTH, Z.; KAIM, M.; BLOCH, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1042-1055, 2004.

XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of reproduction**, v. 53, n. 4, p. 951-957, 1995.

YI, J.; IAN, A. B.; TREVOR, M. Stereospecific reduction of 5beta-reduced steroids by human ketosteroid reductases of the AKR (aldo-keto reductase) superfamily: role of AKR1C1-AKR1C4 in the metabolism of testosterone and progesterone via the 5beta-reductase pathway. **Biochemical journal**, v. 437, n. 1, p. 53-61, 2011.