



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**Função ovariana e produção de embriões em novilhas da
raça Nelore submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar.**

Marcos Rollemberg Mollo

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**BRASÍLIA / DF
JULHO / 2007**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**Função ovariana e produção de embriões em novilhas da raça Nelore submetidas a
baixa ou alta ingestão alimentar.**

MARCOS ROLLEMBERG MOLLO

**ORIENTADOR: RODOLFO RUMPF
CO-ORIENTADOR: ROBERTO SARTORI FILHO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO: 269 / 2007

**BRASÍLIA / DF
JULHO / 2007**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**Função ovariana e produção de embriões em novilhas da raça Nelore submetidas a
baixa ou alta ingestão alimentar.**

MARCOS ROLLEMBERG MOLLO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA
E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE PRODUÇÃO
ANIMAL**

Roberto Sartori Filho
Ph.D. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).
(Co-Orientador) CPF: 135202598-18, E-mail: sartori@cenargen.embrapa.br

APROVADA POR:

Rodolfo Rumpf, Doutor (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).
(Orientador) CPF: 295.718.049-91, E-mail: rodolfo@cenargen.embrapa.br

Jairo Pereira Neves, Doutor (Universidade de Brasília – UnB).
(Examinador interno) CPF: 065.863.509-30, E-mail: jpneves@unb.br

Maria Lúcia Gambarini, Doutora (Universidade Federal de Goiás).
(Examinadora externa) CPF: 048.836.148-67, E-mail: mlgambarini@hotmail.com

BRASÍLIA/DF, 03 de julho de 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Mollo, Marcos Rollemberg

Função ovariana e produção de embriões em novilhas da raça Nelore submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar. / Marcos Rollemberg Mollo; orientação de Rodolfo Rumpf – Brasília, 2007.

45 p.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2007.

1. Bovino. 2. Nutrição 3. Fisiologia ovariana 4. Superovulação 5. Nelore.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

MOLLO, M. R. **Função ovariana e produção de embriões em novilhas da raça Nelore submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2007, 45 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Marcos Rollemberg Mollo

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Função ovariana e produção de embriões em novilhas da raça Nelore submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar.

GRAU: Mestre

ANO: 2007

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Marcos Rollemberg Mollo

CPF: 896.074.221-04

SQS 112 Bloco “C” Apt. 605

CEP: 70375-030 – Brasília/DF – Brasil

(61) 3345-3448 / 8123-0910 marcosmollo@hotmail.com

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, devo agradecer a ambos os orientadores, que me acolheram e fizeram a realização desta dissertação ser possível.

A Roberto Sartori Filho, que esteve presente durante todas as etapas de realização desta dissertação, fornecendo ajudas imprescindíveis.

Aos colegas, pois sem a participação deles não seria possível a finalização deste trabalho, a citar, Aline Carvalho Martins, Alexandre Floriani Ramos, Michele Ricieri Bastos, Monique Mendes Guardieiro, Maria Clara Costa Mattos, Gláucio Lopes Júnior, José de Carvalho Neto e muitos outros da equipe do Cenargen.

Aos meus pais e Luciana Cury Peres, por se manterem presentes e me ajudarem bastante na minha recuperação quando sofri um acidente, no decorrer desta dissertação.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA – e aos funcionários do Campo Experimental Sucupira pelo apoio e pelas instalações, onde foi realizado todo o projeto.

Ao curso de Pós-Graduação da Universidade de Brasília, que me deu suporte durante todo o mestrado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelos auxílios financeiros em forma de bolsa de mestrado. E à FAPDF, por financiar o projeto de pesquisa.

Ao médico veterinário Luis Henrique D. Carrijo, da empresa Integral Nutrição Animal, por ajudar na formulação da dieta usada no projeto e à empresa Integral pelo suprimento de parte das dietas oferecidas aos animais.

Ao pesquisador Moacir Gabriel Saueressig e à Embrapa Cerrados por cederem as novilhas usadas no projeto.

ÍNDICE

Capítulos/Subcapítulos	Página
Introdução geral _____	1
Revisão bibliográfica _____	3
Dinâmica folicular _____	3
Influência da ingestão alimentar na função reprodutiva da fêmea _____	4
Influência da ingestão alimentar nas concentrações sanguíneas de hormônios _____	5
Influência da ingestão alimentar na produção de embriões _____	9
Objetivo geral _____	12
Objetivos específicos _____	13
Hipóteses _____	14
Material e métodos _____	15
Animais _____	15
Dietas tratamentos _____	15
Experimento 1 _____	16
Sincronização do estro _____	16
Exames ultra-sonográficos _____	17
Dosagens hormonais _____	17
Experimento 2 _____	18
Superestimulação ovariana _____	18
Coleta e avaliação embrionária _____	19

Análise estatística	20
Resultados	21
Peso corporal e escore de condição corporal	21
Experimento 1	23
Ciclo estral	23
Experimento 2	28
Discussão	30
Conclusões	34
Referências bibliográficas	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição de matéria seca (MS) e PB da dieta dos animais que estavam recebendo dietas de baixa ou alta ingestão _____	16
Tabela 2. Descrição dos kits utilizados e coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaio obtidos nas dosagens hormonais realizadas _____	18
Tabela 3. Resultados (média ± EP) comparando novilhas com baixa (n = 10) e alta (n = 14) ingestão alimentar em relação à duração e ao comportamento estral _____	23
Tabela 4. Resultados [média ± EP (n) ou porcentagens] das variáveis relacionadas ao ciclo estral em novilhas que apresentaram ciclicidade considerada normal e submetidas a baixa (n = 16) ou alta (n = 18) ingestão alimentar _____	24
Tabela 5. Resultados [média ± EP (n)] comparando novilhas submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar em relação ao desenvolvimento folicular e luteal, durante um ciclo estral _____	25
Tabela 6. Resultados [média ± EP (n)] comparando novilhas submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar em relação às concentrações séricas hormonais, durante o ciclo estral _____	27
Tabela 7. Resultados [média ± EP (n)] comparando novilhas submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar em relação à resposta superovulatória e produção de embriões. _____	29

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Protocolo de superovulação, exames ultra-sonográficos e coletas de sangue ___19
- Figura 2. Peso corporal (kg) dos animais (média \pm erro padrão) com baixa ou alta ingestão alimentar ao longo do período experimental _____21
- Figura 3. Escore de condição corporal (ECC, escala de 1 a 5; média \pm erro padrão) dos animais com baixa ou alta ingestão alimentar ao longo do período experimental _____22
- Figura 4: Relação entre escore de condição corporal (ECC, escala de 1 a 5) e peso corporal (kg) em todas as novilhas _____22
- Figura 5. Padrão de crescimento do folículo dominante (diâmetro; mm²; média \pm erro padrão) da primeira onda folicular em ambos os até o dia 10 do ciclo _____26
- Figura 6. Padrão de crescimento do folículo ovulatório (diâmetro; mm²; média \pm erro padrão) em ambos os, em relação à ovulação (ovulação em D0) _____26
- Figura 7. Padrão de crescimento do corpo lúteo (CL) (volume; mm³; média \pm erro padrão) em ambos os grupos, do dia 3 ao dia 14 do ciclo _____27
- Figura 8. Padrão de concentração de progesterona (P₄; ng/ml; média \pm erro padrão), em ambos os grupos, do dia 3 ao dia 14 do ciclo _____28

LISTA DE ABREVIATURAS

BE	_____	Benzoato do estradiol
CL	_____	Corpo lúteo
CV	_____	Coefficiente de variação
DPBS	_____	Dulbecco Phosphate Buffered Saline
E2	_____	Estradiol
ECC	_____	Escore de condição corporal
EP	_____	Erro padrão
FSH	_____	Hormônio folículo-estimulante
GH	_____	Hormônio de crescimento
GnRH	_____	Hormônio liberador de gonadotrofinas
IA	_____	Inseminação artificial
IGF	_____	Fator de crescimento semelhante à insulina
LH	_____	Hormônio luteinizante
MS	_____	Matéria seca
P4	_____	Progesterona
PGF _{2α}	_____	Prostaglandina F2α
SOV	_____	Superovulação
TE	_____	Transferência de embriões

Função ovariana e produção de embriões em novilhas da raça Nelore submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar

RESUMO GERAL

Este trabalho avaliou o efeito da nutrição na função ovariana e produção de embriões em novilhas da raça Nelore. Novilhas púberes foram submetidas a alta (A, n=20) ou baixa (B, n=19) ingestão, recebendo alimentação à vontade (170%) ou 70% da dieta de manutenção, respectivamente. Foram realizados acompanhamento através de ultra-sonografia trans-retal e coletas de sangue para dosagens hormonais diariamente, durante um ciclo estral completo. Em seguida, as novilhas foram superovuladas e os embriões coletados e avaliados. Na análise estatística, utilizou-se o teste t de Student. As novilhas do grupo A apresentaram duração de estro mais curta e comportamento estral menos intenso. Apesar das novilhas do grupo A terem ovulado folículos maiores ($14,0 \pm 0,2$ vs $11,8 \pm 0,2$ mm), os grupos não diferiram quanto ao pico de estradiol sérico. A taxa de crescimento do folículo ovulatório foi maior no grupo A, podendo estar associada às maiores concentrações séricas de insulina detectadas neste grupo. Não foi detectada diferença nas concentrações séricas de IGF-I total entre os grupos durante o período peri-ovulatório. O volume luteal máximo durante o ciclo estral também foi maior no grupo A, entretanto não houve diferença nas concentrações séricas de progesterona. Apesar das novilhas do grupo A terem apresentado concentrações séricas de insulina mais altas, a resposta superovulatória e o número de estruturas coletadas foram superiores no grupo B. Pelos resultados obtidos, concluiu-se que diferentes níveis de ingestão de matéria seca afetam consideravelmente a fisiologia reprodutiva de fêmeas bovinas, podendo refletir em alterações comportamentais, de ciclicidade e de fertilidade dos animais.

Palavras-chave: bovino, nutrição, fisiologia ovariana, superovulação, Nelore.

Ovarian function and embryo production in Nelore heifers with low or high feed intake

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effect of nutrition on ovarian function and embryo production in Nelore heifers. Pubertal heifers were kept in a feedlot and fed high (H, n=20) or low (L, n=19) energy diets, receiving diet *ad libitum* (~170%) and 70% of a maintenance diet, respectively. Transrectal ultrasound examinations of ovaries and blood sample collections for hormone assays were performed daily during a complete estrous cycle. After that, heifers were superovulated and embryos were collected and evaluated. The Student t test was used for statistical analysis. Heifers from group H showed shorter estrus duration and less intense estrous behavior. Although group H heifers had ovulated greater follicles (14.0 ± 0.2 vs. 11.8 ± 0.2 mm), the groups did not differ in regard to the estradiol surge. Growth rate of the ovulatory follicle was greater in H heifers and that may have been associated with the greater serum insulin concentration observed in this group. There was no difference in serum concentrations of total IGF-I between groups during the periovulatory period. The maximum volume achieved by the corpus luteum during the cycle was also greater in H heifers, however there was no difference between groups in serum progesterone concentrations. Although heifers from group H had shown greater serum insulin concentrations, the superovulatory response and the number of recovered embryos/ova were superior in heifers from group L. Based on the results obtained, we can conclude that different levels of feed intake can affect the reproductive physiology of bovine females, causing alteration in behavior, estrous cycle patterns and fertility in the animals.

Keywords: bovine, nutrition, ovarian physiology, superovulation, Nelore.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, sendo representado principalmente por gado de corte, com predominância da raça Nelore, devido à sua ótima adaptabilidade às regiões brasileiras.

A pecuária brasileira tem tido demanda crescente de animais de elevado mérito genético, o que tem impulsionado o uso de técnicas avançadas de biotecnologia, notadamente aquelas associadas à reprodução animal, tais como a SOV e a transferência de embriões (TE). Atualmente, o Brasil é um dos países que mais geram produtos utilizando estas biotecnologias, porém com resultados muito variáveis e aquém do ideal.

Quanto à SOV, há uma variação individual ao tratamento, observada tanto em vacas ou novilhas *Bos indicus* (Baruselli *et al.*, 2003) quanto em vacas ou novilhas *Bos taurus* (Sartori *et al.*, 2003; Martins, 2005). Esta variabilidade na resposta das doadoras ao tratamento superovulatório é um dos maiores problemas em programas comerciais de TE (Mapletoft *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2002; Barros & Nogueira, 2004). A variabilidade na resposta ovariana está relacionada aos diferentes protocolos superovulatórios, mas também à condição nutricional do animal (Yaakub *et al.*, 1999). Em geral, fêmeas de elevado mérito genético que são utilizadas como doadoras de embriões, geralmente não estão sob manejo nutricional adequado à melhor performance reprodutiva, o que compromete os resultados de TE.

Nutrição está entre os fatores que mais afetam o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas, mas os mecanismos específicos pelos quais a dieta influencia a reprodução ainda permanecem pouco entendidos e ainda precisam ser elucidados. Diversos estudos discutem a influência da nutrição sobre a fertilidade de ruminantes (Butler, 2000; Gong, 2002; Webb *et al.*, 2004). A ingestão de nutrientes age em vários níveis dentro do eixo hipotálamo-hipófise-gônada e afeta fatores de crescimento de origem sistêmica ou local que controlam direta ou indiretamente a função ovariana e a produção embrionária (Armstrong *et al.*, 2001; Gong, 2002).

A energia é o nutriente que mais afeta a reprodução de fêmeas bovinas. A ingestão insuficiente de energia está correlacionada com baixo desempenho reprodutivo, atraso na idade à puberdade, atraso no intervalo da primeira ovulação e cio pós-parto e redução nas taxas de concepção e de prenhez em vacas de corte e de leite. Por outro lado, vários estudos mostram que dietas altamente energéticas diminuem a resposta aos protocolos de SOV,

diminuem a produção embrionária e alteram a expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário. O mecanismo deste efeito ainda não está claro, mas acredita-se que seja consequência da produção de ovócitos com qualidade comprometida (Dunne *et al.*, 1999; Yaakub *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2006).

Neste sentido, faz-se necessário avaliar a influência da nutrição no desempenho reprodutivo de fêmeas da espécie bovina, principalmente quanto à função ovariana e produção de embriões de animais de raças zebuínas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Dinâmica folicular

A dinâmica folicular é um dos fatores mais importantes na fisiologia ovariana e foi largamente estudada em bovinos de raças européias (*Bos taurus*) (Savio *et al.*, 1988, Sirois & Fortune, 1988, Ginther *et al.*, 1989, Knopf *et al.*, 1989, Roche & Boland, 1991, Taylor & Rajamahendran, 1991, Badinga *et al.*, 1994). Porém, estudos da fisiologia ovariana de gado zebu (*Bos indicus*) são limitados, principalmente das importantes raças de leite e de corte brasileiras (Figueiredo *et al.*, 1997; Gambini *et al.*, 1998; Viana *et al.*, 2000). Esta dinâmica folicular ovariana em vacas e novilhas é caracterizada por ondas de crescimento e regressão foliculares durante o ciclo estral (Savio *et al.*, 1988; Ginther *et al.*, 1989; Knopf *et al.*, 1989; Taylor & Rajamahendran, 1991). Com o advento da avaliação da atividade ovariana através de ultra-sonografia trans-retal, pôde-se observar os padrões de crescimento e regressão de folículos antrais em forma de ondas, durante o ciclo estral bovino (Fortune *et al.*, 1988; Pierson & Ginther, 1988; Savio *et al.*, 1988).

O estabelecimento do mecanismo da dominância folicular requer a produção de inibina e E2 pelo folículo dominante, com conseqüente redução da concentração sérica de FSH, limitando o crescimento dos folículos subordinados e os induzindo à atresia (Viana *et al.*, 2000). A seleção do folículo dominante em vacas envolve eventos celulares e endócrinos que não estão completamente elucidados. Várias mudanças fisiológicas têm sido associadas com a seleção folicular, como alteração na taxa de crescimento folicular, diminuição do FSH circulante, aumento do estradiol-17 β circulante, aumento na expressão de receptores para hormônio luteinizante (LH) e aumento do IGF-I livre no fluido folicular (Xu *et al.*, 1995; Ginther *et al.*, 1996; Bao *et al.*, 1997; Ginther, 2000; Beg *et al.*, 2001).

Estudos em *Bos taurus*, principalmente aqueles realizados nos Estados Unidos com a raça Holandês, descreveram a ocorrência de duas a quatro ondas foliculares (Ginther *et al.*, 1989; Knopf *et al.*, 1989; Townson *et al.*, 2002; Sartori *et al.*, 2004) durante um ciclo estral, sendo que a maioria dos animais apresentou duas ondas. Um estudo realizado no Brasil com Nelore (Figueiredo *et al.*, 1997) observou ciclos com duas ou três ondas foliculares, havendo predomínio de duas ondas nas vacas e de três ondas nas novilhas. Segundo Viana *et al.* (2000), bovinos usualmente demonstram duas ou três ondas foliculares durante o ciclo estral, mas ciclos com uma (Savio *et al.*, 1988; Santos, 1993) ou quatro ondas foliculares já foram

encontrados (Sirois & Fortune, 1988; Santos, 1993; Townson *et al.*, 2002; Sartori *et al.*, 2004).

Ginther *et al.* (1989), Taylor e Rajamahendran (1991) e Figueiredo *et al.* (1997) sugeriram que o número de ondas foliculares, em bovinos, é regulado pela duração da fase luteal. Por manter alta a concentração de P4, o corpo lúteo (CL) boqueia a ovulação de folículos ovulatórios funcionais, induzindo sua atresia e o início de uma nova onda folicular.

Alguns fatores diferentes da duração da fase luteal podem também ser responsáveis pela variação no número de ondas foliculares. O menor tamanho do folículo dominante da onda intermediária, comparado com o folículo ovulatório, pode ter contribuição no aumento do número de ondas.

Murphy *et al.* (1991) observaram que novilhas mestiças Holandês x Hereford subalimentadas (70% da dieta de manutenção) apresentaram predominância de três ondas foliculares (5/7 = 71%), e 20% (1/5) das superalimentadas (180% da dieta de manutenção) possuíam três ondas foliculares no ciclo estral.

Quanto à dimensão folicular, Townson *et al.* (2002) relataram maior tamanho dos folículos ovulatórios em vacas com duas ondas foliculares, quando comparadas a vacas com três ondas. Ahmad *et al.* (1997) mostraram taxa de crescimento do folículo ovulatório de 1,0 mm por dia para novilhas e vacas com duas ondas e de 1,5 mm por dia para novilhas e vacas com três ondas foliculares. Além disso, novilhas e vacas com três ondas foliculares tendem a ter intervalo interovulatório mais longo que fêmeas da mesma categoria com duas ondas (Savio *et al.*, 1988; Sirois & Fortune, 1988; Ginther *et al.*, 1989; Knopf *et al.*, 1989; Taylor & Rajamahendran, 1991; Ahmad *et al.*, 1997; Townson *et al.*, 2002 apud Sartori *et al.*, 2004).

Influência da ingestão alimentar na função reprodutiva da fêmea

A reprodução sofre influência de vários fatores como espécie, raça, idade, escore de condição corporal (ECC) e nutrição. A importância da nutrição na performance reprodutiva é amplamente reconhecida (Robinson, 1990, Dunn & Moss, 1992; Wade & Schneider, 1992; Gutierrez *et al.*, 1997a,b).

A performance reprodutiva parece ser diferente em vacas com alta ou com baixa ingestão de alimento. Os mecanismos pelos quais ocorrem efeitos da nutrição na performance reprodutiva ainda não são bem compreendidos. Além disso, sabe-se que a performance

reprodutiva de vacas de corte está associada ao ECC (Selk *et al.*, 1988; Humblot *et al.*, 1996; Morrison *et al.*, 1999; Bossis *et al.*, 2000), o qual pode afetar a persistência do folículo dominante (Rhodes *et al.*, 1995; Viana *et al.*, 2000), o desenvolvimento folicular ovariano, a proliferação das células da granulosa e a esteroidogênese (Adamiak *et al.*, 2005).

O aumento energético na dieta foi associado ao aumento no recrutamento de pequenos folículos durante a primeira onda folicular do ciclo estral de novilhas holandesas (Gutierrez *et al.*, 1997a,b), indicando que a nutrição parece afetar o recrutamento de pequenos folículos, mas não a seleção e dominância folicular. Em ovelhas, um período de *flushing* (aumento agudo na dieta) elevou o número de folículos presentes no ovário e a taxa de ovulação (Downing & Scaramuzzi, 1991).

A restrição na dieta suprime a secreção de LH em vacas de corte (Richards *et al.*, 1989; Bossis *et al.*, 1999; Bossis *et al.*, 2000), além de diminuir a persistência e o tamanho máximo do folículo dominante, aumentando a incidência de ciclos de três ondas em novilhas cíclicas (Murphy *et al.*, 1991). Bergfeld *et al.* (1994) relataram que novilhas alimentadas com pouca energia possuem menores folículos dominantes e, conseqüentemente, menores concentrações periféricas de E2 que novilhas alimentadas com alta energia.

A restrição dietética prolongada resulta em término dos ciclos estrais, em vacas e novilhas, quando esta restrição é de 50% da energia de manutenção por 26,5 semanas (Imakawa *et al.*, 1986 apud Rhodes *et al.*, 1996; Richards *et al.*, 1989). Logo, quantidades insuficientes de alimento na dieta dos animais influenciam o desenvolvimento folicular chegando ao extremo de causar condição anovulatória, quando as fêmeas são submetidas a períodos prolongados de desnutrição (Rhodes *et al.*, 1996; Bossis *et al.*, 2000).

Numerosos trabalhos relataram a performance reprodutiva da fêmea bovina sob influência de alguns fatores. Sartori *et al.* (2002a,b; 2004) compararam vacas holandesas lactantes a novilhas, ou vacas lactantes a não lactantes e observaram diferenças entre os grupos, relacionadas à função ovariana, à qualidade embrionária e à concentração sérica de hormônios esteróides.

Influência da ingestão alimentar nas concentrações sanguíneas de hormônios

Estudos têm relatado que vacas lactantes desenvolvem maior folículo dominante/ovulatório, mas têm menor concentração sérica de E2 que novilhas (Ahmad *et al.*, 1996; Sartori *et al.*, 2004; Wolfenson *et al.*, 2004) ou vacas secas (De La Sota *et al.*, 1993).

De fato, estudos que compararam novilhas a vacas lactantes (Wolfenson *et al.*, 2004); e vacas secas a vacas lactantes (De La Sota *et al.*, 1993) observaram concentrações séricas de hormônios esteróides inferiores nas vacas lactantes.

Baixas concentrações séricas de esteróides têm, potencialmente, numerosas conseqüências fisiológicas que podem comprometer a reprodução das vacas lactantes (Sartori *et al.*, 2004). A redução no pico de E2 circulante pode ser causa da menor duração do estro ou menor intensidade de comportamento estral em vacas lactantes (Nebel *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 2004) ou da baixa taxa de detecção do estro, em vacas lactantes (Senger, 1994). Além disso, pode contribuir para falhas na fecundação, problemas de desenvolvimento embrionário precoce (King *et al.*, 1994; DeSouza & Murray, 1995) e pode influenciar em alguns tipos de anestro em vacas lactantes (Wiltbank *et al.*, 2002).

Uma das explicações para estas menores concentrações séricas é que a elevada ingestão de MS promove maior metabolismo dos hormônios esteróides (Parr *et al.*, 1993a, b; Sangsritavong *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2003) e, conseqüentemente, menores concentrações sangüíneas circulantes. Nolan *et al.* (1998) descreveram maior concentração sérica de P4 em novilhas com alimentação restrita comparadas às superalimentadas. Estas alterações nas concentrações sangüíneas de P4 e E2 podem afetar os padrões de desenvolvimento folicular (Sirois & Fortune, 1988; Knopf *et al.*, 1989) e a viabilidade de ovócitos e embriões (Folman *et al.*, 1973; Fonseca *et al.*, 1983; Ashworth *et al.*, 1989; King *et al.*, 1994; Desouza & Murray, 1995; Mann *et al.*, 1998).

O maior metabolismo de E2 nas vacas lactantes leva o folículo a crescer mais antes que alcance concentração suficiente de E2 para induzir o pico de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH)/LH e conseqüente ovulação (Sartori *et al.*, 2004), o que pode explicar o fato de vacas lactantes terem tamanho maior do folículo ovulatório.

O IGF estimula a proliferação das células da granulosa bovina dos folículos pequenos, resultando no crescimento folicular (Gong *et al.*, 1997). Além disso, as concentrações sangüíneas de IGF-I em bovinos são diretamente influenciadas pelo nível nutricional dos animais (Houseknecht *et al.*, 1988). Durante períodos de alimentação restrita em vacas, as concentrações sangüíneas de IGF-I decrescem (Spicer *et al.*, 1990). Portanto, em casos de superalimentação, há maior concentração de IGF-I, conseqüentemente, maior crescimento folicular.

O maior tamanho folicular leva a um maior número de células da granulosa, resultando em um maior CL, já que há uma correlação positiva entre tamanho do folículo ovulatório e tamanho do CL. Vasconcelos *et al.* (1999) e Sartori *et al.* (2002a) observaram que vacas que ovularam folículos maiores possuíam, conseqüentemente, maiores CLs e maior produção de P4, porém apresentaram menor taxa de concepção e uma tendência a maior perda embrionária que vacas que ovularam folículos menores.

Estudos comparando novilhas a vacas lactantes (Sartori *et al.*, 2004; Wolfenson *et al.*, 2004) e vacas secas a vacas lactantes (De La Sota *et al.*, 1993) relataram menor concentração de P4 em fêmeas lactantes que em fêmeas não lactantes. Assim, vacas lactantes ovularam folículos maiores e geraram CLs maiores, porém tiveram menor concentração de P4, possivelmente devido a um maior metabolismo de P4 nestas vacas lactantes.

Uma baixa concentração sérica de P4 antes da inseminação artificial (IA) está associada a uma redução da fertilidade (Folman *et al.*, 1973; Fonseca *et al.*, 1983), e suplementação de P4 antes da IA aumenta a taxa de prenhez (Folman *et al.*, 1990; Wehrman *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1997). A baixa concentração sérica de P4 causa o aumento da frequência dos pulsos de LH (Roberson *et al.*, 1989; Bergfelt *et al.*, 1991; Adams *et al.*, 1992), causando maturação prematura do ovócito (Revah & Butler, 1996) com queda na qualidade ovocitária no momento da ovulação e, conseqüentemente, baixa qualidade embrionária após a fecundação (Ahmad *et al.*, 1995).

O IGF-I, produzido no fígado, mas também em menores proporções em outros tecidos, influencia a regulação do desenvolvimento folicular. Gong *et al.* (1997) demonstraram que o IGF-I e a insulina estimulam a proliferação e esteroidogênese das células da granulosa bovina dos folículos pequenos (2 a 5 mm) e atuam em sinergismo com gonadotrofinas, aumentando a sensibilidade das células da granulosa a estas, além de ajudar na maturação ovocitária e no desenvolvimento inicial dos embriões (Mariana *et al.*, 1991; Kane *et al.*, 1997).

O hormônio de crescimento (GH), IGF-I e insulina são fisiologicamente inter-relacionados e respondem a mudanças nutricionais (Pell & Bates, 1990; Thissen *et al.*, 1994 apud Gutierrez *et al.*, 1997a,b). O nível de nutrição e o ECC influenciam nas concentrações de IGF-I, nos folículos ovarianos (Ryan *et al.*, 1994; Monget & Martin, 1997), tal como afirmam Adamiak *et al.* (2005) quando relatam que as concentrações plasmáticas de IGF-I são positivamente correlacionadas com o ECC. Concentrações de insulina e IGF-I se elevam com o aumento de nutriente, ao passo que a concentração de GH diminui com a diminuição

de nutrientes (Breier *et al.*, 1986; Foster *et al.*, 1989; Clarke *et al.*, 1993 apud Gutierrez *et al.*, 1997a,b).

Elevação na concentração plasmática de IGF-I está associada ao aumento no diâmetro máximo dos folículos dominantes. Adamiak *et al.* (2005) concluíram que as concentrações plasmáticas de IGF-I foram maiores em novilhas com ECC moderado, comparadas a novilhas com ECC baixo, porém estas concentrações não foram afetadas pelo nível de dieta. Além de ação direta no ovário, o IGF-I pode afetar funções da hipófise (Soldani *et al.*, 1995; Wilson, 1995 apud Bossis *et al.*, 2000) e do hipotálamo (Hiney *et al.*, 1991; Hiney *et al.*, 1996; Longo *et al.*, 1998 apud Bossis *et al.*, 2000).

In vitro, GH (Gong *et al.*, 1994), insulina e IGF-I (Gutierrez *et al.*, 1997b) estimulam a proliferação e a esteroidogênese das células da granulosa, em bovinos, mas não há evidência direta do efeito *in vivo* do IGF-I no desenvolvimento folicular, em vacas, apesar dele ser importante para a maturação ovocitária e para o desenvolvimento embrionário (Siddiqui *et al.*, 2002). Apesar disso, um aumento da concentração periférica de IGF-I foi associado à maior taxa de gêmeos, em vacas (Echternkamp *et al.*, 1990), e a concentração intra-folicular de IGF-I foi positivamente associada ao diâmetro folicular (Spicer *et al.*, 1988). Concentrações maiores de IGF-I extra-ovariano aumentam o crescimento folicular e a esteroidogênese (Campbell *et al.*, 1995) e podem ser uma justificativa dos efeitos da nutrição no desenvolvimento folicular. A nutrição pode provocar mudanças no número de folículos pequenos, que são independentes de mudanças nos níveis periféricos de FSH, mas positivamente associados com a concentração de insulina circulante. As concentrações de GH e IGF-I total não estão relacionadas ao aumento no recrutamento de folículos pequenos (Gutierrez *et al.*, 1997a,b).

Mudanças no nível de insulina estão estreitamente relacionadas a mudanças em IGF-I (O'Callaghan & Boland, 1999). Um aumento do nível de glicose no sangue resultou em maior concentração de insulina, o que promoveu o aumento na taxa de ovulação, em ovelhas (Downing *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1997), porém reduziu a secreção de LH (Downing & Scaramuzzi, 1997).

Não foram observadas diferenças nas concentrações de FSH ou no padrão de secreção de FSH, com alteração na dieta. Portanto, alteração no número de folículos pequenos, ocorrida com aumento da ingestão da dieta, parece ser independente de mudanças na concentração de FSH (Gutierrez *et al.*, 1997a,b).

Influência da ingestão alimentar na produção de embriões

Há controvérsias na literatura quanto ao efeito dos níveis energéticos ou quantidade de MS ingerida na resposta a protocolos de SOV. Alguns trabalhos detectaram efeitos positivos da alta ingestão na população folicular e número de ovulações (Gutierrez *et al.*, 1997b; Gong *et al.*, 2002), outros não detectaram efeito e outros detectaram efeito contrário (Mantovani *et al.*, 1993; Nolan *et al.*, 1998; Yaakub *et al.*, 1999; Wrenzycki *et al.*, 2000; Siddiqui *et al.*, 2002).

Segundo Siddiqui *et al.* (2002), um nível nutricional que limite o ECC em 2,5 a 3,0 (escala de 1 a 5) em vacas zebu antes de um tratamento de SOV seria melhor do que um alto nível nutricional. Em concordância, Adamiak *et al.* (2005) acreditam que o efeito do nível nutricional sobre as qualidades ovocitária e embrionária é dependente do ECC inicial da fêmea bovina.

Yaakub *et al.* (1999) compararam novilhas que receberam três quilos de concentrado a novilhas que receberam concentrado *ad libitum* e observaram que as que receberam menos concentrado apresentaram melhor resposta ao tratamento com FSH, refletida no número de embriões recuperados e no número de embriões transferíveis, concluindo que a resposta superovulatória ao FSH foi afetada pela quantidade de dieta oferecida. De fato, alimentação excessiva em vacas (Blanchard *et al.*, 1990) e ovelhas (McEvoy *et al.*, 1995) tem sido associada com redução na recuperação e na qualidade embrionária.

Tanto Purwantara *et al.* (1993) quanto Nasser *et al.* (1993) afirmaram que o número de folículos no início do tratamento com FSH pode influenciar na resposta superovulatória. A quantidade da dieta pode ser um dos fatores que controlam o desenvolvimento folicular ou a situação ovariana antes do início da SOV (Yaakub *et al.*, 1999).

Trabalhando com novilhas superovuladas, Nolan *et al.* (1998) não observaram diferença em número de CLs ao compararem novilhas subalimentadas às superalimentadas. Já Siddiqui *et al.* (2002) encontraram diferença no número de CLs palpáveis, sendo que vacas superalimentadas apresentaram menor número destes. Isto condiz com Mackey *et al.* (1997) e Nolan *et al.* (1998), que afirmam que a dieta restrita suprime o folículo dominante limitando seu tamanho e maximiza a taxa de ovulação em tratamento superovulatório. Já quanto à qualidade dos embriões, o fornecimento de alta quantidade de alimento para os animais

acarretou na redução no desenvolvimento embrionário em ovelhas (McEvoy *et al.*, 1995) e novilhas superovuladas (O'Callaghan & Boland, 1999; Yaakub *et al.*, 1999).

Nutrição excessiva durante a SOV e durante o desenvolvimento embrionário inicial tem efeito deletério, em vacas superovuladas (Nolan *et al.*, 1998; Yaakub *et al.*, 1999). Em outros dois estudos, novilhas superovuladas que receberam dietas com menores níveis energéticos produziram mais embriões transferíveis, comparadas às alimentadas com altos níveis de concentrado (Nolan *et al.*, 1998).

Efeitos deletérios da alta ingestão de MS foram comprovados em ovelhas, refletidos no aumento da mortalidade embrionária (Parr *et al.*, 1987). Estudos realizados em Wisconsin, EUA, comparando qualidade embrionária em vacas de alta produção de leite e alta ingestão alimentar a novilhas ou vacas não lactantes demonstraram menor viabilidade embrionária nas vacas lactantes (Sartori *et al.*, 2002b). Nesses experimentos, dentre os embriões coletados seis dias após IA de vacas holandesas com alta produção leiteira (>40 kg/dia) não superovuladas, 52% não estavam viáveis. Por outro lado, novilhas nulíparas e vacas não lactantes geraram 72% e 82% de embriões viáveis, respectivamente.

Após oito aplicações de FSH (600 UI), houve tendência das novilhas sob dieta restrita apresentarem maior número de folículos, maior número de CLs e maior número de embriões transferíveis que novilhas superalimentadas (Nolan *et al.*, 1998). Estudos prévios mostraram redução na resposta ovulatória quando administrada dieta *ad libitum* (Yaakub *et al.*, 1996). Mantovani *et al.* (1993) relataram que mais embriões transferíveis foram recuperados de animais em dieta com pouco concentrado comparados a animais em dieta com muito concentrado, concordando com Negrão *et al.* (1997), que concluíram que a produção de embriões transferíveis aumenta quando o consumo de dieta diminui.

Em contrapartida, Adamiak *et al.* (2005) observaram que o número de folículos grandes (> 8 mm) e médios (4-8 mm) foi maior em novilhas que receberam dieta equivalente a duas vezes o requerimento de manutenção (2M), comparadas a novilhas que receberam uma vez os requerimentos de manutenção (M). O número de folículos pequenos (< 4mm) não foi afetado pelos tratamentos. Os autores observaram também que a taxa de crescimento e o diâmetro máximo do folículo dominante foram maiores nas novilhas superalimentadas. Já Gong *et al.* (2002) relataram maior número de folículos pequenos (2-4mm), levando a um maior número de folículos grandes (> 9mm), em novilhas com dieta 2M, comparadas às com dieta M, após tratamento com FSH.

No estudo de Chagas e Silva *et al.* (2002), onde compararam vacas lactantes a novilhas, as vacas tiveram menos estruturas, menos ovócitos fecundados e menos embriões viáveis que as novilhas. Além disso, nas vacas, foi observada menor concentração de P4 no diestro que nas novilhas. As menores resposta superovulatória, taxa de fecundação e recuperação de embriões viáveis das vacas lactantes em relação às novilhas foram associadas às menores concentrações de P4 durante o diestro. As diferenças encontradas entre novilhas e vacas lactantes na concentração de P4, na resposta superovulatória e na recuperação embrionária podem estar relacionadas com a condição nutricional das doadoras durante o tratamento de SOV (Butler, 2000).

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi estabelecer a influência da nutrição na performance reprodutiva em novilhas da raça Nelore, sob manejo nutricional natural do Brasil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar as características de crescimentos folicular e luteal, a incidência de ondas foliculares, os tamanhos folicular e luteal, a duração do ciclo estral e as concentrações séricas de IGF-I, insulina e dos hormônios reprodutivos E2 e P4, em novilhas submetidas a alta ou baixa ingestão alimentar.

2. Determinar a resposta a um protocolo de SOV, resposta esta baseada em: número de folículos ≥ 3 mm de diâmetro no início da superestimulação com FSH; número de folículos ≥ 6 mm no final da superestimulação; número de CLs no dia da coleta dos embriões; número de estruturas totais coletadas e número de embriões viáveis coletados, em novilhas submetidas a alta ou baixa ingestão alimentar.

HIPÓTESES

Novilhas submetidas à alta ingestão alimentar apresentam crescimentos folicular e luteal maiores, repercutindo em tamanhos folicular e luteal maiores. Além disso, estes animais têm um número menor de ondas foliculares. Quanto às concentrações séricas, quando se trata de IGF-I e insulina, o grupo de alta ingestão apresenta maior concentração destes hormônios, ao passo que este mesmo grupo tem menores concentrações séricas de E2 e P4 graças a um possível metabolismo acentuado desses esteróides.

Baixa ingestão alimentar proporciona melhor resposta superovulatória e melhor qualidade dos embriões produzidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram desenvolvidos. No experimento 1, animais alimentados com baixa ou alta ingestão foram avaliados quanto ao comportamento e duração do estro, padrões de crescimento folicular e luteal, incidência de ondas foliculares, tamanhos foliculares e luteais, duração de ciclo estral, e concentrações séricas de IGF-I, insulina, P4 e E2. No experimento 2, a população folicular ao início e no final da SOV, além do número de ovulações e de embriões produzidos foram comparados entre novilhas recebendo baixa ou alta ingestão alimentar.

Animais

Foram usadas 44 novilhas da raça Nelore com idade entre 24 e 36 meses e peso corporal de $390,0 \pm 6,8$ kg. Todas as novilhas passaram por exame ginecológico, anteriormente ao projeto propriamente dito.

Dietas tratamento

As novilhas foram divididas, aleatoriamente, em dois grupos experimentais, recebendo 70% da dieta de manutenção (baixa ingestão = grupo B) ou dieta *ad libitum* (alta ingestão = grupo A) (tabela 1) e foram mantidas em sistema de confinamento no Campo Experimental Sucupira, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF), onde foi realizado todo o projeto.

Os animais receberam dieta de manutenção para adaptação por um período de 7 dias, e foram divididos nos dois grupos experimentais. Passaram então mais três semanas de adaptação à dieta experimental (baixa ou alta ingestão), antes do início do experimento, totalizando 9 semanas recebendo as dietas experimentais. As novilhas tiveram acesso irrestrito à água e sal mineral.

Além disso, o peso e a condição corporal (escala de 1 a 5; Houghton et al., 1990) foram avaliados semanalmente. Como as dietas eram em quantidade proporcional ao peso

corporal, estas eram reformuladas semanalmente, já que o peso corporal variava a cada semana.

Tabela 1. Composição de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) da dieta dos animais que estavam recebendo dietas de baixa ou alta ingestão.

	Kg/cab/d	% MS	Total kg MS/d	% PB	Total proteína (kg)	% PB
<i>Baixa ingestão</i>						
Feno de Coast-cross	2,1	85,0	1,79	13,0	0,23	
Silagem de milho	9,1	25,0	2,28	9,0	0,2	
Suplemento energético/protéico*	0,35	9,0	0,32	22,0	0,07	
Total	11,55		4,38		0,5	11,52
% do peso vivo			1,08			
<i>Alta ingestão</i>						
Feno de Coast-cross	5,4	85,0	4,59	13,0	0,6	
Silagem de milho	23,4	25,0	5,85	9,0	0,52	
Suplemento energético/protéico*	0,9	9,0	0,81	22,0	0,18	
Total	29,7		11,25		1,3	11,52
% do peso vivo			2,78			

*Boião PPU (Integral Produbom, Goiânia, GO).

Experimento 1

Sincronização do estro

Durante o período de adaptação à dieta experimental, as novilhas foram submetidas à sincronização de estro. No Dia 0 receberam dispositivo intra-vaginal de P4 (DIB, Syntex S.A., Argentina) e foram aplicados 2,0 mg de benzoato de estradiol - BE (Ric-BE, Tecnopec,

Brasil), 7 dias depois foi retirado o dispositivo e foram aplicados 0,15 mg im de cloprostenol (Prolise, ARSA S.L.R., Argentina). Após 11 dias, outra aplicação de cloprostenol, na mesma dose, foi realizada. Em seguida, as novilhas foram monitoradas constantemente (24 h por dia) por dois observadores, até o dia em que a ovulação foi detectada por ultra-sonografia. A observação de estro serviu para identificar o número de montas e o número de aceites de montas, responsáveis por caracterizar a intensidade do estro de cada novilha, além de fomentar informações para a definição da duração do mesmo. Das 44 novilhas iniciadas no programa, 24 foram detectadas em estro e cinco não ovularam após a segunda aplicação de cloprostenol. Estas cinco novilhas anovulatórias foram removidas do estudo.

Exames ultra-sonográficos

A partir da segunda injeção de prostaglandina (PGF_{2α}), exames ultra-sonográficos ovarianos trans-retais e coletas de sangue foram realizados diariamente até o final do intervalo de ovulações (Sartori *et al.*, 2004). Os exames ultra-sonográficos foram realizados por um único operador, utilizando um aparelho de ultra-som em tempo real (Aloka SSD-500 V; Corometrics Medical Systems Inc., Wallingford, CT, USA) com probe linear trans-retal de 7,5 MHz, para mensuração dos folículos e CLs, onde avaliou-se os padrões de crescimento folicular e luteal, incidência de ondas foliculares, tamanhos foliculares e luteais e duração do ciclo estral.

A dominância folicular foi considerada quando um folículo (folículo dominante) se destacava em tamanho dos demais folículos (folículos subordinados). A emergência da onda foi considerada quando o futuro folículo dominante apresentava o tamanho de 4,0 mm. A mensuração dos folículos baseou-se no diâmetro que apresentavam e a dos CLs no volume dos mesmos, desconsiderando-se o volume da cavidade, naqueles que a possuíam (Sartori *et al.*, 2004).

Dosagens hormonais

O sangue foi coletado, diariamente, por punção dos vasos coccígeos e acondicionado em tubos de Vacutainer, em seguida foi refrigerado por 24 h e centrifugado a 1600 x g, por 15

min. O soro obtido foi estocado a -20°C, para análises posteriores das concentrações de IGF-I, insulina, P4 e E2.

As dosagens hormonais foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal, do CENARGEN / EMBRAPA. As dosagens de P4, E2 e insulina foram realizadas pela técnica de radioimunoensaio, e para IGF-I, ensaio imunorradiométrico (IRMA). Os kits utilizados para cada ensaio e os respectivos coeficientes de variação (CV) estão descritos na tabela 2. As dosagens de P4 foram realizadas durante o ciclo estral completo. As dosagens de E2 foram realizadas 1 e 2 dias antes da ovulação que precedeu o ciclo, ou seja, Dias 0 e -1 do ciclo, e 1 e 2 dias antes da ovulação ao final deste ciclo estral avaliado. A dosagem de IGF-I foi realizada no Dia 0 do ciclo estral. As dosagens de insulina foram feitas no Dia 0 do ciclo estral, dia do início do protocolo de SOV e dia da primeira aplicação de FSH na SOV. As dosagens de IGF-I total foram realizadas após extração de acordo com as instruções presentes no kit. Para análise de E2, as amostras de soro sofreram dupla extração com éter dietílico e o ensaio foi realizado utilizando-se kit com modificações, de acordo com Kulick *et al.* (1999).

Tabela 2. Descrição dos kits utilizados e coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaio obtidos nas dosagens hormonais realizadas.

Ensaio	Kit		CV intra-ensaio (%)	CV inter-ensaio (%)
Progesterona	Coat-a-Count	Progesterone,	8,2	8,4
	DPC-Medlab (TKPG2)			
Estradiol 17β	DSL-39100,	Estradiol 3 ^a	10,5	3,4
	geração RIA			
Insulina	Coat-a-Count	Insulin, DPC-	1,9	-
	Medlab (TKIN5)			
IGF-I total	DSL-5600	IRMA Active™	5,8	-

Experimento 2

Superestimulação ovariana

Para o experimento 2, foram utilizados os mesmos animais e o sistema de manejo do experimento 1. Após a avaliação do ciclo estral completo, no experimento 1, as novilhas

foram superovuladas com FSH seguindo o protocolo de transferência de embrião em tempo fixo (figura 1): 8 injeções de FSH im a cada 12 horas em doses decrescentes, utilizando um total de 133 mg de Folltropin-V (Bioniche Animal Health Canadá Inc.) por animal, e PGF_{2α} (D-cloprostenol; Prolise; ARSA S. R. L. Buenos Aires, Argentina) na sexta e sétima aplicações de FSH (próximo ao final do tratamento com FSH). Em seguida, as novilhas foram detectadas em estro, inseminadas artificialmente e os embriões foram coletados e classificados 7 dias após o estro. As avaliações ultra-sonográficas dos ovários foram realizadas em dias estratégicos, conforme figura 1. Tais dias foram: D0, para visualização do estado ovariano; D4, para avaliação do recrutamento folicular antes da estimulação com FSH; D7, para avaliação da resposta superestimulatória ao FSH; D11 e D15, para avaliação da resposta superovulatória.

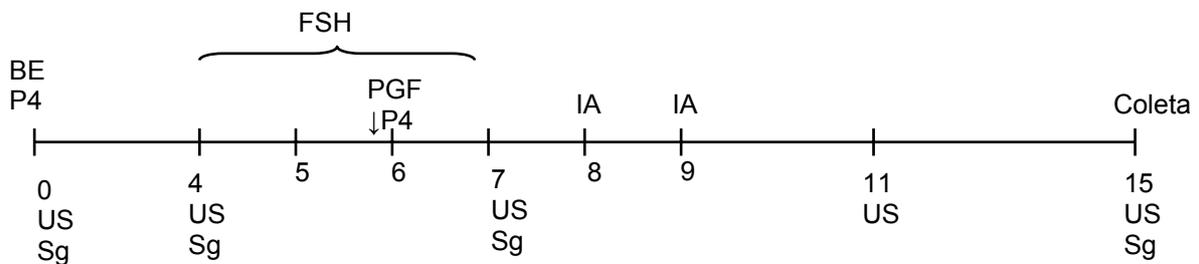


Figura 1. Protocolo de superovulação, exames ultra-sonográficos e coletas de sangue. Legenda: 0 a 15 = dias em relação à aplicação de BE; US = exame ultra-sonográfico; Sg = coleta de sangue; BE = benzoato de estradiol; DIB = implante de progesterona; PGF = prostaglandina F_{2α}; FSH = hormônio foliculo-estimulante.

Coleta e avaliação embrionária

Para a realização das coletas de embriões, as novilhas foram contidas em tronco individual e foi realizada anestesia peridural com 3,0 ml de lidocaína a 2%. Neste experimento, foi utilizada a técnica de coleta dupla, relatada por Castro Neto *et al.* (2005), na qual o balão do catéter de Foley foi posicionado no corpo uterino justaposto ao último anel cervical e foram usados, em média, 1000 ml de Dulbecco Phosphate Buffered Saline (DPBS) por animal. Após a lavagem uterina, o útero foi preenchido com DPBS e o catéter mantido no local e sua abertura lacrada com uma presilha de filtro de coleta. Em seguida, as novilhas foram soltas e retornaram ao tronco 20 a 30 minutos depois, para a coleta do DPBS que estava

no útero e a realização de um segundo lavado com um volume extra de 500 ml de DPBS. O material recuperado do útero foi coletado em filtro de 75 µm com devida identificação para cada animal e transportado para o laboratório, onde os embriões foram procurados e avaliados em um estereomicroscópio (Zeiss – Stemi SV6, Holanda). Os embriões foram classificados segundo o grau de desenvolvimento e qualidade, de acordo com o manual da International Embryo Transfer Society - IETS (Stringfellow & Seidel, 1999).

As variáveis avaliadas no experimento 2 foram: número de folículos ≥ 3 mm de diâmetro no início da onda folicular (momento da primeira aplicação de FSH do protocolo de SOV), número de folículos ≥ 6 mm de diâmetro ao final da SOV (momento da última aplicação de FSH), quantidade de CLs no dia da coleta de embriões, número e porcentagem de estruturas e de embriões viáveis, por tratamento. Os números de folículos foram avaliados por exames ultra-sonográficos.

Análise estatística

Para análise estatística, as variáveis contínuas foram avaliadas pelo teste T e as variáveis binomiais foram avaliadas pelo teste do Qui-quadrado. Para as variáveis com medidas repetidas, utilizou-se a opção “REPEATED” do programa Statistical Analysis System (SAS[®]).

RESULTADOS

Peso corporal e escore de condição corporal

As novilhas submetidas à baixa ingestão alimentar perderam peso (de 390 para 362 kg, sendo 1,84 kg por semana) e diminuíram o ECC (de 3,6 a 2,7), ao contrário das novilhas do grupo A, que engordaram (de 390 para 481 kg, sendo 4,07 kg por semana) e aumentaram o ECC (de 3,7 a 4,2). A partir da sexta semana do experimento, ou seja, duas semanas após o início do fornecimento das dietas experimentais, detectou-se diferença entre os grupos ($P < 0,05$), em peso corporal. O ECC apresentou diferença a partir da primeira semana após o início do fornecimento das dietas experimentais ($P < 0,05$). Ambas as diferenças aumentaram gradativamente até o final do experimento (semana 14) (figuras 2 e 3). Foi observada uma correlação positiva entre peso corporal e ECC, conforme se observa na figura 4.

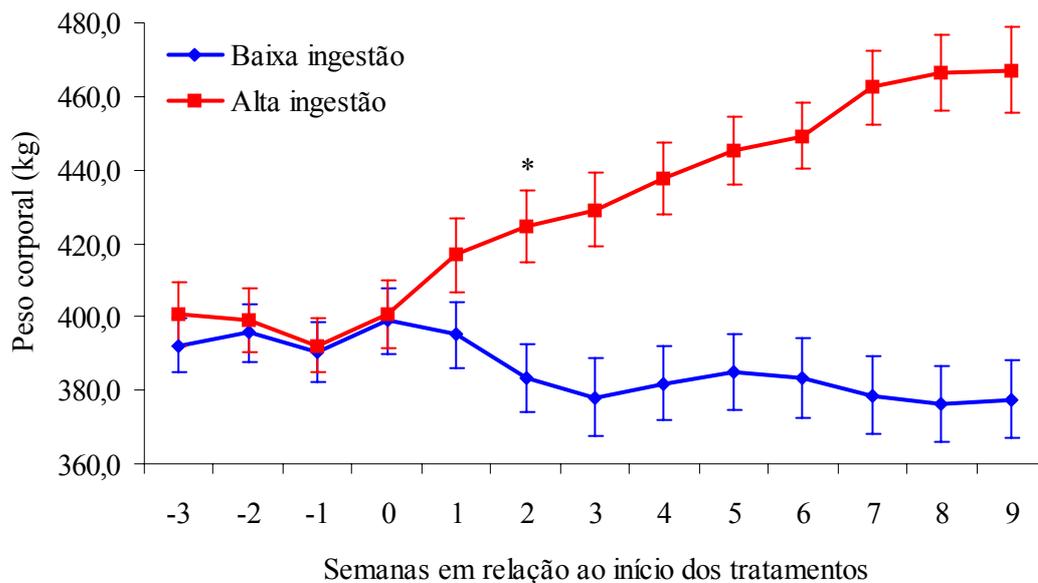


Figura 2. Peso corporal (kg) dos animais (média \pm EP) com baixa ($n = 19$) ou alta ($n = 20$) ingestão alimentar ao longo do período experimental, com quatro semanas recebendo dieta de manutenção (-3 a 0) e nove semanas recebendo as dietas experimentais (1 a 9). *A partir da segunda semana após o início dos tratamentos, detectou-se diferença ($P < 0,05$) no peso corporal médio entre os grupos.

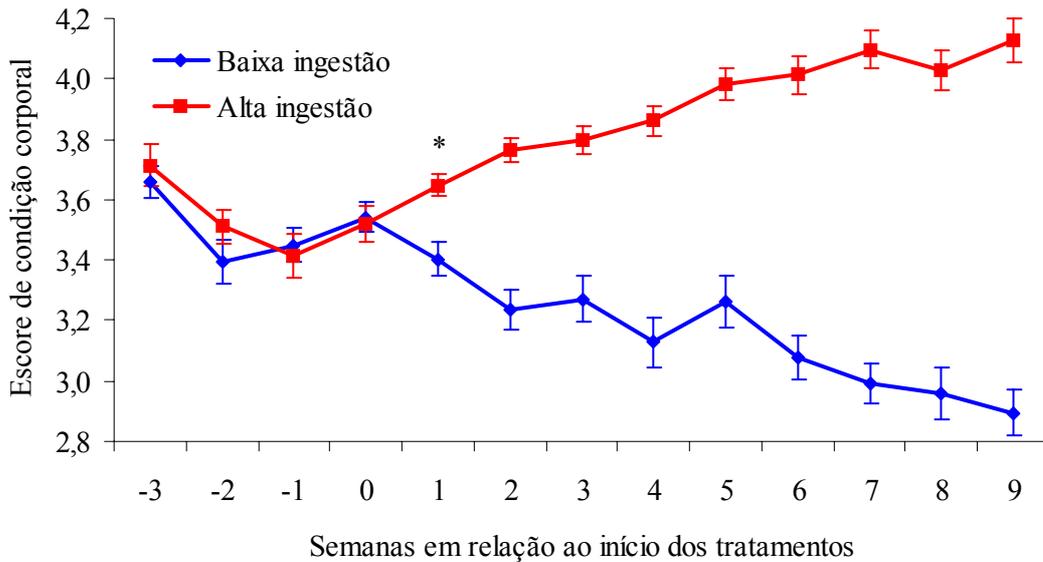


Figura 3. Escore de condição corporal (ECC, escala de 1 a 5; média \pm EP) dos animais com baixa (n = 19) ou alta (n = 20) ingestão alimentar ao longo do período experimental, com quatro semanas recebendo dieta de manutenção (-3 a 0) e nove semanas recebendo as dietas experimentais (1 a 9). *A partir da primeira semana após o início dos tratamentos, detectou-se diferença ($P < 0,05$) no ECC médio entre os grupos.

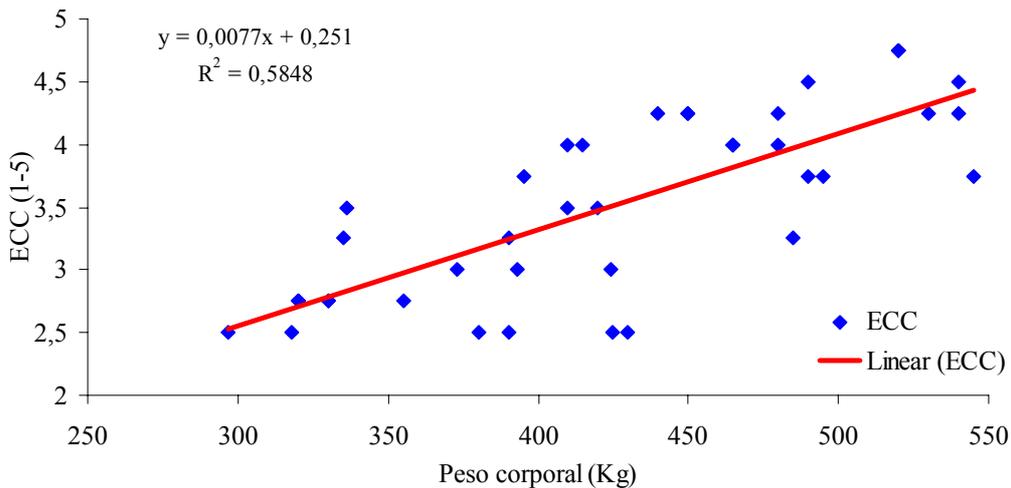


Figura 4: Relação entre escore de condição corporal (ECC, escala de 1 a 5) e peso corporal (kg) em todas as novilhas.

Experimento 1

Ciclo estral

Três novilhas no grupo B e duas no grupo A não ovularam após a aplicação do cloprostenol, e foram removidas do estudo.

Das novilhas que foram detectadas em estro após a aplicação de cloprostenol (n = 24), aquelas do grupo de alta ingestão alimentar tenderam a apresentar duração de estro mais curta (P = 0,07) e apresentaram comportamento estral menos intenso, caracterizado pelo menor número de montas e de aceites de montas por parte destas novilhas (P < 0,01), quando comparadas às do grupo de baixa ingestão (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados (média ± EP) comparando novilhas com baixa (n = 10) e alta (n = 14) ingestão alimentar em relação à duração e ao comportamento estral.

	Baixa ingestão	Alta ingestão	P
Duração do estro; h	17,1 ± 2,5	10,7 ± 2,2	0,07
Aceites de monta; n	29,8 ± 5,1	8,9 ± 1,9	<0,01
Montas; n	35,8 ± 6,5	11,8 ± 2,7	<0,01

Ao final do ciclo estral, o momento da luteólise foi similar (P = 0,74) nos dois grupos e ocorreu, em média, no dia 18,0 ± 0,5. Dos 39 animais avaliados no estudo, 34 (16 do grupo de baixa ingestão e 18 do grupo de alta ingestão alimentar) possuíam ciclo estral normal, caracterizado pela ovulação do folículo dominante presente no dia da luteólise (Sartori *et al.*, 2004). Nestes animais que apresentaram ciclo estral normal, a duração média ou o número de ondas deste ciclo não diferiram entre os tratamentos (tabela 4). Ao agrupar-se as informações dos dois grupos, a distribuição de ciclos com duas, três e quatro ondas foi de 26,5, 52,9 e 17,6%, respectivamente. Além disso, houve uma novilha no grupo de baixa ingestão com cinco ondas no ciclo (tabela 4). O dia da emergência da segunda onda folicular e a duração entre a emergência da última onda e a ovulação também não diferiram entre os grupos. Entretanto, novilhas do grupo de baixa ingestão levaram 1,7 dias a mais para ovularem após a luteólise do que as de alta ingestão (tabela 4).

Tabela 4. Resultados [média \pm EP (n) ou porcentagens] das variáveis relacionadas ao ciclo estral em novilhas que apresentaram ciclicidade considerada normal e submetidas a baixa (n = 16) ou alta (n = 18) ingestão alimentar.

	Baixa ingestão	Alta ingestão	P
Dias entre ovulações	23,4 \pm 1,3 (16)	21,4 \pm 0,7 (18)	0,18
Dia da luteólise	18,5 \pm 1,1	18,1 \pm 0,5	0,75
Número de ondas	3,1 \pm 0,2	2,9 \pm 0,2	0,51
Ciclos com 2 ondas; % (n/n)	25,0 (4/16)	27,8 (5/18)	0,85
Ciclos com 3 ondas; % (n/n)	50,0 (8/16)	55,6 (10/18)	0,77
Ciclos com 4 ondas; % (n/n)	18,7 (3/16)	16,6 (3/18)	0,55
Ciclos com 5 ondas; % (n/n)	6,3 (1/16)	0,0 (0/18)	0,28
Dia da emergência da 2ª onda folicular	9,6 \pm 0,5 (19)	9,2 \pm 0,5 (20)	0,54
Dias entre emergência da última onda e a ovulação	9,7 \pm 0,6	8,5 \pm 0,5	0,16
Dias entre luteólise e ovulação	6,9 \pm 0,5 (16)	5,2 \pm 0,3 (18)	0,004

Os tamanhos máximos dos maiores folículos subordinados da primeira e da última ondas não diferiram entre os grupos (tabela 5). Entretanto, novilhas do grupo de alta ingestão tiveram folículos dominantes e ovulatórios maiores do que as com baixa ingestão (tabela 5, figuras 5 e 6). A taxa de crescimento do folículo ovulatório (tabela 5 e figura 6) e o volume luteal máximo também foram superiores no grupo de alta ingestão (tabela 5, figura 7).

Tabela 5. Resultados [média \pm EP (n)] comparando novilhas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar em relação ao desenvolvimento folicular e luteal, durante um ciclo estral.

	Baixa ingestão	Alta ingestão	P
Tamanho máximo do folículo dominante da 1ª onda; mm	10,7 \pm 0,3 (19)	12,6 \pm 0,3 (20)	<0,01
Tamanho máximo do maior folículo subordinado da 1ª onda; mm	6,4 \pm 0,3 (19)	7,0 \pm 0,3 (20)	0,16
Tamanho do folículo ovulatório no momento da luteólise; mm	7,1 \pm 0,4 (16)	8,8 \pm 0,6 (18)	0,03
Tamanho máximo dos folículos ovulatórios ao início e final do ciclo; mm	11,8 \pm 0,2 (35)	14,0 \pm 0,2 (38)	<0,01
Tamanho máximo do maior folículo subordinado da última onda; mm	6,7 \pm 0,3 (18)	7,0 \pm 0,3 (19)	0,55
Taxa de crescimento do folículo ovulatório; mm/d	0,90 \pm 0,06 (18)	1,22 \pm 0,05 (19)	<0,01
Volume luteal máximo; mm ³	4095,9 \pm 173,7 (19)	5198,6 \pm 376,0 (20)	<0,01

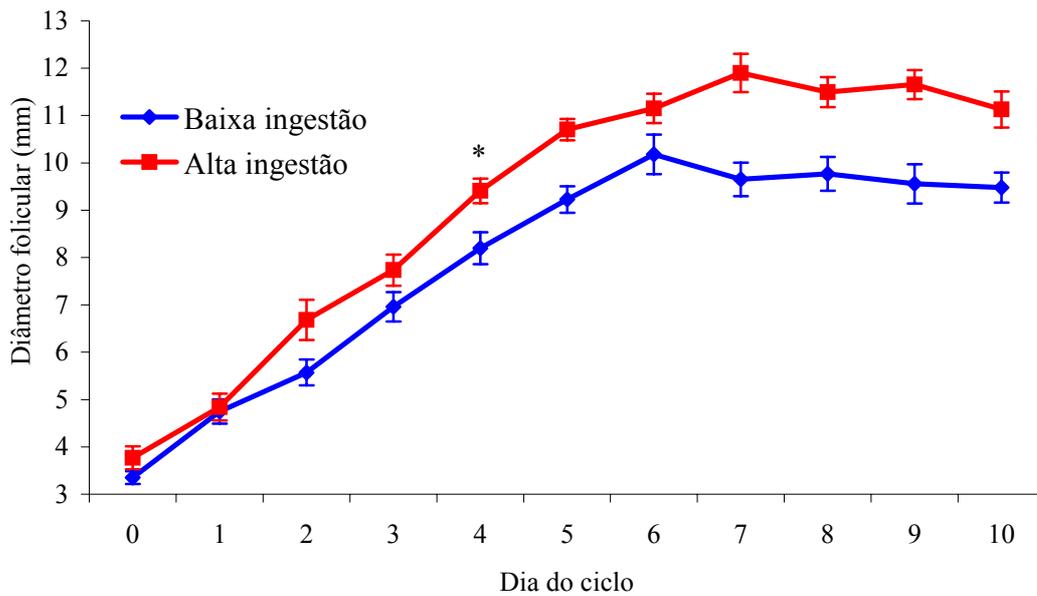


Figura 5. Padrão de crescimento do foliculo dominante (diâmetro; mm²; média ± EP) da primeira onda folicular em ambos os grupos (grupo B, n = 19 e grupo A, n = 20) até o dia 10 do ciclo. *A partir do dia 4 do ciclo estral, detectou-se diferença (P < 0,05) entre os grupos.

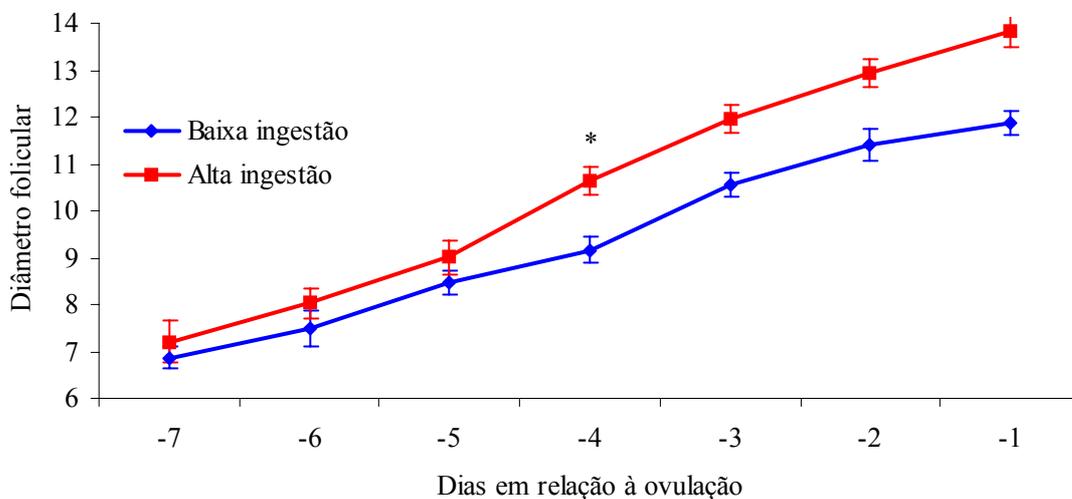


Figura 6. Padrão de crescimento do foliculo ovulatório (diâmetro; mm²; média ± EP) em ambos os grupos (grupo B, n = 18 e grupo A, n = 19), em relação à ovulação (ovulação em D0). *A partir do dia -4 em relação à ovulação, detectou-se diferença (P < 0,05) entre os grupos.

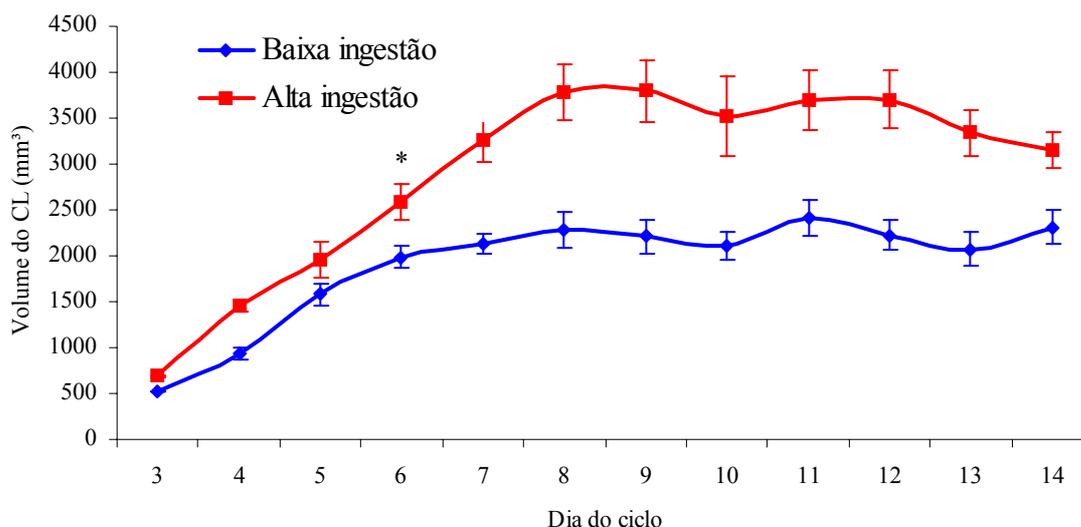


Figura 7. Padrão de crescimento do CL (volume; mm³; média ± EP) em ambos os grupos (grupo B, n = 19 e grupo A, n = 20), do dia 3 ao dia 14 do ciclo. *A partir do dia 6 do ciclo estral, detectou-se diferença (P < 0,05) entre os grupos.

Nas dosagens hormonais, com exceção da concentração sérica de insulina no D0 do ciclo estral, que foi mais alta no grupo de alta ingestão, os demais hormônios circulantes não diferiram entre os tratamentos (tabela 6 e figura 8).

Tabela 6. Resultados [média ± EP (n)] comparando novilhas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar em relação às concentrações séricas hormonais, durante o ciclo estral.

	Baixa ingestão	Alta ingestão	P
Concentração sérica máxima de estadiol antes das ovulações (pg/ml)	14,3±1,5 (30)	12,8±0,6 (29)	0,35
Concentração sérica de insulina no D0 do ciclo estral (μUI/ml)	7,9 ± 1,6 (19)	14,6 ± 1,6 (20)	<0,01
Concentração sérica de IGF-I no D0 do ciclo estral (ng/ml)	588,9 ± 22,5 (19)	569,8 ± 23,2 (20)	0,56
Concentração sérica máxima de P4 no ciclo estral (ng/ml)	5,2 ± 0,6 (19)	5,6 ± 0,4 (19)	0,50

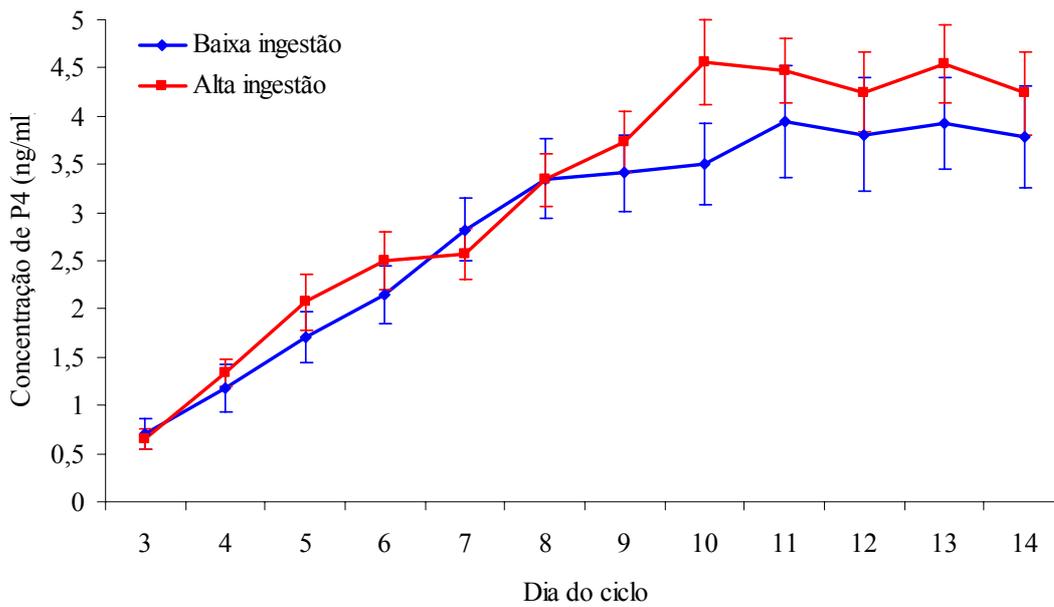


Figura 8. Padrão de concentração de progesterona (P4; ng/ml; média \pm EP), em ambos os grupos (grupo B, n = 19 e grupo A, n = 19), do dia 3 ao dia 14 do ciclo.

Experimento 2

Apesar das novilhas submetidas à alta ingestão alimentar apresentarem concentrações séricas de insulina mais altas tanto no primeiro dia do protocolo de SOV ($12,7 \pm 2,0$ e $3,3 \pm 0,9$ μ UI/ml; $P < 0,001$) quanto no último dia da aplicação de FSH ($13,8 \pm 2,7$ e $4,9 \pm 0,9$ μ UI/ml; $P = 0,006$), em relação ao grupo de baixa ingestão, as respostas superestimulatória e superovulatória foram superiores nas novilhas do grupo de baixa ingestão alimentar (tabela 7). Além disso, coletou-se um número maior de estruturas (embriões ou ovócitos não fecundados) das novilhas submetidas à baixa ingestão. Quanto ao número de embriões transferíveis coletados, não se detectou diferença entre os grupos (tabela 7).

Tabela 7. Resultados [média \pm EP (n)] comparando novilhas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar em relação à resposta superovulatória e produção de embriões.

	Baixa ingestão	Alta ingestão	P
Folículos \geq 3 mm no dia da primeira aplicação de FSH para SOV; n	43,6 \pm 6,5 (18)	32,6 \pm 5,0 (20)	0,11
Folículos \geq 6 mm no dia da última aplicação de FSH para SOV; n	48,4 \pm 7,2 (18)	24,0 \pm 7,9 (20)	0,005
Resposta superovulatória (CLs); n	33,6 \pm 5,8 (18)	15,7 \pm 6,0 (20)	0,01
Estruturas (embriões e/ou ovócitos não fecundados) coletadas; n	10,5 \pm 1,3 (17)	6,6 \pm 2,7 (20)	0,05
Embriões transferíveis; n	5,7 \pm 1,2 (17)	3,8 \pm 1,3 (20)	0,17

DISCUSSÃO

As novilhas do grupo com alta ingestão ganharam peso corporal e ECC, e as novilhas do grupo de baixa ingestão perderam ECC, como esperado, mas mantiveram o peso corporal, pois se encontravam em crescimento.

Foi observado que duas novilhas entraram em anestro, sendo uma de cada grupo. A novilha que estava em restrição alimentar possivelmente sofreu influência da nutrição na ciclicidade, pois segundo Imakawa *et al.* (1986) e Richards *et al.* (1989), uma restrição dietética prolongada resulta em término dos ciclos estrais em vacas e novilhas, além disso, quantidades insuficientes de alimento na dieta dos animais influenciam no desenvolvimento folicular chegando ao extremo de causar condição anovulatória quando as fêmeas são submetidas a períodos prolongados de desnutrição (Bossis *et al.*, 2000; Rhodes *et al.*, 1996). Rhodes *et al.* (1996) demonstraram que a iminência do anestro nutricional é acompanhada por falha na ovulação do folículo dominante, o que foi observado nas novilhas que entraram em anestro.

No presente estudo, novilhas submetidas à restrição alimentar apresentaram duração de estro mais prolongada e comportamento estral mais intenso, quando comparadas às novilhas superalimentadas. Comportamento estral é uma variável reprodutiva sabidamente influenciada pelo nível de produção leiteira em bovinos. Por exemplo, Nebel *et al.* (1997) compararam novilhas nulíparas a vacas lactantes das raças Holandês e Jersey em relação às características de estro e observaram que as novilhas aceitaram mais montas por estro comparadas às vacas, e tiveram maior duração de estro. Em um estudo que avaliou a associação entre níveis de produção de leite e comportamento de estro, Lopez *et al.* (2004) observaram menor duração e intensidade de estro nas vacas de maior produção (> 39,5 kg/dia) comparadas às de menor produção (< 39,5 kg/dia) de leite. Essas diferenças de comportamento estral entre categorias distintas de animais, dentro da mesma raça, parecem estar relacionadas aos menores níveis circulantes de E2 em vacas lactantes comparadas às novilhas (Sartori *et al.*, 2002a; 2004) e menor E2 em vacas de maior produção de leite comparado a vacas de menor produtividade, como demonstrado por Lopez *et al.* (2004). No presente estudo, interessantemente, detectou-se uma diferença substancial no comportamento estral entre os grupos experimentais, apesar de não ter-se detectado diferença no pico pré-ovulatório de E2. Especula-se que, devido a um possível maior metabolismo dos hormônios

esteróides nas novilhas com alta ingestão, tenha havido uma menor sensibilização do sistema nervoso ao E2 e conseqüente menor expressão de estro.

A fase luteal age como determinante principal do número de ondas foliculares (Ginther *et al.*, 1989; Taylor & Rajamahendran, 1991; Figueiredo *et al.*, 1997), o que condiz com o encontrado no trabalho atual, onde não foram detectadas diferenças na duração da fase luteal, no número de ondas e no intervalo de ovulações entre os grupos experimentais.

A restrição na dieta, segundo Murphy *et al.* (1991), diminuiu a persistência e o tamanho máximo do folículo dominante e tendeu a aumentar a incidência de ciclos de três ondas foliculares em novilhas cíclicas. Por outro lado, a maioria das novilhas superalimentadas apresentou duas ondas foliculares no ciclo estral. Estes dados contrastam, de certa forma, com os resultados do presente experimento, onde foi constatado que em novilhas com baixa ingestão alimentar, apesar de terem apresentado menor tamanho máximo do folículo dominante, sua persistência e a incidência de ciclos com três ondas foliculares não diferiram do grupo com alta ingestão. Além disso, o grupo de alta ingestão alimentar apresentou uma maior taxa de crescimento do folículo ovulatório e menor tempo entre a luteólise e a ovulação, que podem estar relacionados às maiores concentrações circulantes de insulina observadas neste grupo, uma vez que é sabido que a insulina estimula a proliferação das células da granulosa, estando portanto diretamente relacionada ao crescimento folicular.

O menor diâmetro do folículo dominante encontrado em novilhas com restrição alimentar, comparadas às novilhas com alta ingestão de alimento, confirmou os dados de Murphy *et al.* (1991) e Sartori *et al.* (2002a, 2004) e pode ser devido à produção de E2 insuficiente para causar a cascata luteolítica ou para induzir o pico de GnRH/LH e conseqüente ovulação. Outra possibilidade seria que fêmeas submetidas à restrição alimentar teriam pulsatilidade reduzida de LH (Richards *et al.*, 1989; Bossis *et al.*, 1999; Bossis *et al.*, 2000) com conseqüente menor estímulo para crescimento do folículo dominante. Além disso, a menor taxa de crescimento do folículo ovulatório nessas novilhas pode explicar o maior período entre a luteólise e a ovulação, pois o folículo dominante levaria mais tempo para produzir concentração de E2 suficiente para desencadear a ovulação.

O maior volume luteal está relacionado ao maior tamanho do folículo ovulatório, como observado por Vasconcelos *et al.* (1999) e Sartori *et al.* (2002a). Este achado também ocorreu no presente estudo, no qual novilhas que apresentaram maior folículo ovulatório (alta ingestão alimentar) também apresentaram maior volume luteal.

Apesar de ovularem folículos maiores e terem tido maior volume luteal, as novilhas com alta ingestão tiveram concentrações séricas de E2 e P4 similares ao grupo de baixa ingestão. Fato semelhante foi observado por Sartori *et al.* (2002a) ao compararem vacas holandesas lactantes a vacas não lactantes, com menor ingestão alimentar. A ovulação de folículos maiores e conseqüente formação de CLs mais volumosos pode ter ocorrido em função da elevada ingestão de MS, promovendo maior metabolismo dos hormônios esteróides (Parr *et al.*, 1993a, b; Sangsritavong *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2003), acarretando maior “clearance” hepático, o que resulta em menor concentração sangüínea desses hormônios.

As maiores concentrações séricas de insulina detectadas no Dia 0 do ciclo estral, dia do início do protocolo de SOV e no dia da primeira aplicação de FSH na SOV nos animais submetidos à alta ingestão alimentar coincidem com relatos anteriores (Gutierrez *et al.*, 1997b; Armstrong *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2002). Entretanto, a ausência de diferença nas concentrações séricas de IGF-I total entre os grupos no presente estudo pode ser considerada como um achado inesperado, uma vez que mudanças no nível de insulina relacionam-se estreitamente a mudanças em IGF-I sérico (O’Callaghan & Boland, 1999). Além disso, segundo outros trabalhos (Houseknecht *et al.*, 1988; O’Callaghan & Boland, 1999; Armstrong *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2002), as concentrações sangüíneas de IGF-I em bovinos são positivamente influenciadas pelo nível nutricional dos animais.

A menor população folicular ao início do protocolo de SOV e a resposta superovulatória e produção embrionária inferiores nas novilhas com alta ingestão contradizem relatos de outros estudos que observaram aumento no recrutamento de pequenos folículos durante a primeira onda folicular do ciclo estral associado ao aumento na dieta (Gutierrez *et al.*, 1997a,b; Gong *et al.*, 2002). Além disso, Downing & Scaramuzzi (1991) constataram que ovelhas recebendo aumento agudo na dieta (*flushing*) tiveram maior número de folículos presentes no ovário e maior taxa de ovulação. Por outro lado, estes resultados, aparentemente contraditórios, concordam com relatos de um grande número de estudos que detectou efeito contrário da alta ingestão alimentar na população folicular e número de ovulações em ruminantes superovulados (Mantovani *et al.*, 1993; Nolan *et al.*, 1998; Yaakub *et al.*, 1999; Wrenzycki *et al.*, 2000; Siddiqui *et al.*, 2002; Lozano *et al.*, 2003).

Quanto à qualidade embrionária, esperava-se que novilhas com alta ingestão produzissem embriões de qualidade inferior, quando comparadas ao grupo com menor ingestão de MS, uma vez que o fornecimento de alta quantidade de alimento acarreta em redução da qualidade embrionária em novilhas superovuladas (O’Callaghan & Boland, 1999;

Yaakub *et al.*, 1999). Entretanto, o trabalho atual não detectou diferença entre os grupos, apesar de haver indício de maior produção de embriões viáveis nas novilhas com baixa ingestão, o que poderia ser constatado em experimentos com número maior de unidades experimentais.

CONCLUSÕES

Nas condições do presente experimento, conclui-se que alterações na quantidade de MS/energia ingerida, por novilhas da raça Nelore, podem alterar padrões metabólicos e função reprodutiva, levando a mudanças na dinâmica de crescimentos folicular e luteal ovarianos.

Não houve efeito detectável dos diferentes níveis de ingestão alimentar nos padrões de ondas foliculares e na duração do ciclo estral.

As alterações hormonais e/ou metabólicas causadas pela mudança na quantidade de MS/energia ingerida podem também afetar a resposta à SOV, refletida pela variação no número de folículos estimulados e ovulados, além da alteração no número de embriões produzidos, a depender do nível nutricional a que estão submetidos os animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMIAK SJ, MACKIE K, WATT RG, WEBB R, SINCLAIR KD, 2005. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biol. Reprod.** 73, 918-926.
- ADAMS GP, MATTERI RL, KASTELIC JP, KO JCH, GINTHER OJ, 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergency of follicular waves in heifers. **J. Reprod. Fertil.** 94:177-188.
- AHMAD N, BEAM SW, BUTLER WR, DEEVER DR, DUBY RT, ELDER DE, FORTUNE JE, GRIEL LC, JONES LS, MILVAE RA, PATE JL, REVAH I, SCHREIBER DT, TOWNSON DH, TSANG PCW, INSKEEP EK, 1996. Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. **J. Anim. Sci.** 74:1943-1952.
- AHMAD N, SCHRICK FN, BUTCHER RL, INSKEEP EK, 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. **Biol. Reprod.** 52:1129-1135.
- AHMAD N, TOWNSEND EC, DAILEY RA, INSKEEP EK, 1997. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. **Anim. Reprod. Sci.** 49:13-28.
- ARMSTRONG DG, GONG JG, GARDNER JO, BAXTER G, HOGG CO, WEBB R, 2002. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. **Reproduction** 123, 371-378.
- ARMSTRONG DG, GUTIERREZ CG, HOGG CO, CAMPBELL BK, WEBB R, 1996. The expression of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) mRNA in primary cultures of bovine granulosa and theca cells. **J. Reprod. Fertil.** Abstr. Series 17:31(abstr.).
- ARMSTRONG, D.G.; MCEVOY, T.G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J.J.; HOGG, C.O.; WOAD, K.J.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D., 2001. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biol. Reprod.** v.64, p. 1624-1632.
- ASHWORTH CJ, SALES DI, WILMUT I, 1989. Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. **J. Reprod. Fertil.** 87:23-32.
- BADINGA L, THATCHER WW, WILCOX CJ, MORRIS G, ENTWISTLE K, WOLFENSON D, 1994. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentration of estradiol-17 β , progesterone and luteinizing hormone in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 42, n. 8, p. 1263-1274.
- BAO B, GARVERICK HA, SMITH GW, SMITH MF, SALFEN BE, YOUNGQUIST RS, 1997. 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. **Biol. Reprod.** 56:1158-1168.

BARROS CM, NOGUEIRA MFG, 2004. SOV em zebuínos de corte. **In: 1º. Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada.** Londrina, p. 212-222.

BARUSELLI PS, MARQUES MO, REIS EL, NASSER LFT, SILVA RCP, MENEGATTI JÁ, VALENTIN R, SANTOS ICC, 2003. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). In: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2003, Fortaleza. **Acta Scientiae Veterinarie**, p. 244-245.

BEG MA, BERGFELT DR, KOT K, WILTBANK MCW, GINTHER OJ, 2001. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biol. Reprod.** 64:432-441.

BERGFELD EGM, KOJIMA FN, CUPP AS, WEHRMAN ME, PETERS KE, GARCIA-WINDER M, KINDER JE, 1994. Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. **Biol. Reprod.** 51:1051-1057.

BERGFELT DR, KASTELIC JP, GINTHER OJ, 1991. Continued periodic emergence of follicular waves in non-bred progesterone-treated heifers. **Anim. Reprod. Sci.** 24:193-204.

BESNARD N, PISSELET C, ZAPF J, HORNEBECK W, MONNAIUX D, MONGET P, 1996. Proteolytic activity is involved in changes in intrafollicular insulin-like growth and atresia of ovine ovarian follicles. **Endocrinology** 137:1599.

BLANCHARD T, FERGUSON J, LOVE L, TAKEDA T, HENDERSON B, HASLER J, CHALUPA W, 1990. Effect of dietary crude-protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle. **Anim. J. Vet. Res.** 51, 905-908.

BOSSIS I, WETTEMANN RP, WELTY SD, VIZCARRA J, SPICER LJ, 2000. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. **Biol. Reprod.** 62, 1436-1444.

BOSSIS I, WETTEMANN RP, WELTY SD, VIZCARRA JA, SPICER LJ, DISKIN MG, 1999. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. **J. Anim. Sci.** 77:1536-1546.

BREIER BH, BASS JJ, BUTLER JH, GLUCKMAN PD, 1986. The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status on pulsatile release of growth hormone and circulating concentrations of insulin-like growth factor 1. **Endocrinology** 111:209.

BUTLER WR, 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 60-61, 449-457.

CAMPBELL BK, SCARAMUZZI RJ, WEBB R, 1995. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 49:335.

- CASTRO NETO AS, SANCHES BV, BINELLI M, SENEDA MM, PERRI SH AND GARCIA JF, 2005. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. **Theriogenology** 63:1249-1255.
- CHAGAS E SILVA J, LOPES DA COSTA L, ROBALO SILVA J, 2002. Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. **Anim. Reprod. Sci.** 69, 1-8.
- CLARKE IJ, FLETCHER TP, POMARES CC, HOLMES JHG, DUNSHEA F, THOMAS GB, TILBROOK AJ, WALTON PE, GALLOWAY DB, 1993. Effect of high-protein feed supplements on concentrations of growth hormone (GH), insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in plasma and on the amounts of GH and messenger RNA for GH in the pituitary glands of adults rams. **J. Endocrinol.** 138:421.
- DE LA SOTA RL, LUCY MC, STAPLES CR, THATCHER WW, 1993. Effects of recombinant bovine somatotropin (Somatotrope) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 76:1002-1013.
- DESOUZA MM E MURRAY MK, 1995. An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. **Endocrinology** 136:2485-2496.
- DOWNING JA E SCARAMUZZI RJ, 1991. Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the gonadotrophic and metabolic hormones in sheep. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 43: 209.
- DOWNING JA E SCARAMUZZI RJ, 1997. The effect of the infusion of insulin during the luteal phase of oestrus cycle on the ovulation rate and on plasma concentration of LH, FSH and glucose in ewes. **Theriogenology** 47, 747-759.
- DOWNING JA, JOSS J, SCARAMUZZI RJ, 1995. Ovulation rate and the concentration of gonadotrophins and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrus cycle. **J. Endocrinol.** 146, 403-410.
- DUNN TG E MOSS GE, 1992. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. **J. Anim. Sci.** 70, 1580.
- DUNNE LD, DISKIN MG, BOLAND MP, O'FARRELL KJ, SREENAN JM, 1999. The effect of pre- and post-insemination plane of nutrition on embryo survival in beef heifers. **Animal Science** 69:411-17.
- ECHTERNKAMP SE, SPICER LJ, GREGORY KE, CANNING SF, HAMMOND JM, 1990. Concentrations of insulin-like growth factor-1 in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. **Biol. Reprod.** 43:8.
- FIGUEIREDO RA, BARROS CM, PINHEIRO OL, SOLER JMP, 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505.

- FOLMAN Y, KAIM M, HERZ Z, ROSENBERG M, 1990. Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. 2. Effects of progesterone and parity on conception. **J. Dairy Sci.** 73:2817-2825.
- FOLMAN Y, ROSENBERG M, HERZ Z, DAVIDSON M, 1973. Relationship between plasma progesterone concentration and conception in postpartum dairy-cows maintained on 2 levels of nutrition. **J. Reprod. Fertil.** 34:267-278.
- FONSECA FA, BRITT JH, MCDANIEL BT, WILK JC, RAKES AH, 1983. Reproductive traits of holsteins and jersey – effects of age, milk-yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection on estrus, conception rate, and days open. **J. Dairy Sci.** 66:1128-1147.
- FORTUNE JE, SIROIS J, QUIRK SM, 1988. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous-cycle. **Theriogenology** 29:95-109.
- FOSTER DL, EBLING FJP, MICKA AF, VANNERSON LA, BUCHOLTZ DC, WOOD RI, SUTTIE JM, FENNER DE, 1989. Metabolic interfaces between growth and reproduction. I. Nutritional modulation of gonadotrophin, prolactin, and growth hormone secretion in the growth-limited female lamb. **Endocrinology** 125:342.
- GAMBINI ALG, MOREIRA MBP, CASTILHO C, BARROS CM, 1998. Desenvolvimento folicular e sincronização da ovulação em vacas da raça Gir. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 22, n. 4, p. 201-210.
- GINTHER OJ, 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Anim. Reprod. Sci.** 60:61-79.
- GINTHER OJ, KNOPF L, KASTELIC JP, 1989. Temporal association among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **J. Reprod. Fertil.**, v.87, n.1, p. 223-230.
- GINTHER OJ, WILTBANK MC, FRICKE PM, GIBBONS JR, KOT K, 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.** 55:1187-1194.
- GONG JG, ARMSTRONG DG, BAXTER G, HOGG CO, GARNSWORTHY PC, WEBB R, 2002. The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology** 57, 1591-1602.
- GONG JG, BAXTER G, BRAMLEY TA, WEBB R, 1997. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. **J. Reprod. Fertil.** 110:91-97.
- GONG JG, MCBRIDE D, BRAMLEY TA, WEBB R, 1994. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. **J. Endocrinol.** 143:157.
- GONG JG. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. **Domestic Animal Endocrinology** v.23, p. 229-241, 2002.

- GUTIERREZ CG, OLDHAM J, BRAMLEY TA, GONG JG, CAMPBELL BK, WEBB R, 1997a. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. **J. Anim. Sci.** 1876-1884.
- GUTIERREZ CG, CAMPBELL BK, WEBB R, 1997b. Development of a long term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to FSH and morphological characteristics. **Biol. Reprod.** 56:608.
- HINEY JK, OJEDA SR, DEES WL, 1991. Insulin-like growth factor I: a possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. **Neuroendocrinology** 54:420-423.
- HINEY JK, SRIVASTAVA V, NYBERG CL, OJEDA SR, DEES WL, 1996. Insulin-like growth factor-I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. **Endocrinology** 137:3717-3728.
- HOUGHTON PL; LEMENAGER RP; HENDRIX KS; MOSS GE; STEWART TS. Effects of body composition, pre- and postpartum energy intake and stage of production of energy utilization by beef cows. **J. Anim. Sci.**, v.68, p.1447-1456, 1990.
- HOUSEKNECHT KL, BOGGS DL, CAMPION DR, SARTIN JL, KISER TE, RAMPACEK GB, AMOS HE, 1988. Effect of dietary energy-source and level on serum growth-hormone, insulin-like growth factor-I, growth and body condition in beef heifers. **J. Anim. Sci.** 66:2916-2923.
- HUMBLOT P, GRIMARD B, RIBON O, KHIREDINE B, DERVISHI V, THIBIER M, 1996. Sources of variation of post-partum cyclicity, ovulation and pregnancy rates in primiparous Charolais cows treated with norgestomet implants and PMSG. **Theriogenology** 46:1085-1096.
- IMAKAWA K, DAY ML, GARCIA-WINDER M, ZALESKY DD, KITTOCK RJ, SCHANBACHER BD, KINDER JE, 1986. Endocrine changes during restoration of estrous cycles following induction of anestrus by restriction of nutrient intake. **J. Anim. Sci.** 63:565-571.
- KANE MT, MORGAN PM, COONAN C, 1997. Peptide growth factors and preimplantation development. **Hum. Reprod.** Update 3, 137-157.
- KING RS, ANDERSON SH, KILLIAN GJ, 1994. Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. **J. Andrology** 15:468-478.
- KNOPF L, KASTELIC JP, SCHALLENBERGER E, GINTHER OJ, 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 6, n. 2, p. 111-119.
- KULICK LJ, KOT K, WILTBANK MC, GINTHER OJ, 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular waves in heifers. **Theriogenology**; 52; 913-921.
- LONGO KM, SUN Y, GORE AC, 1998. Insulin-like growth factor-I effects on gonadotropin-releasing hormone biosynthesis in GT1-7 cells. **Endocrinology** 139:1125-1132.

- LOPEZ H, SATTER LD, WILTBANK MC, 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v.81, p.209-223.
- LOZANO JM, LONERGAN P, BOLAND MP, O'CALLAGHAN D, 2003. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. **Reproduction**, 125:543-53.
- MACKKEY DR, SREENAN JM, ROCHE JF, DISKIN MG, 1997. The effect of acute changes in energy intake on follicle wave turnover in beef heifers. **Irish J. Agric. Food Res.** 36, 95-96 (Abstract).
- MANN GE, LAMMING GE, ROBINSON RS, WATHES DC, 1998. The regulation of interferon-t production and uterine hormone receptors during early pregnancy. **J. Reprod. Fertil.** 54(supl.):317-328.
- MANTOVANI R, ENRIGHT WJ, KEANE MG, ROCHE JF, BOLAND MP, 1993. Effect of nutrition on follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers. **Proc 9th AETE**; 234; Abstract.
- MAPLETOFT RJ, STEWARD KB, ADAMS GP, 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reprod. Nutr. Dev.** Nov-Dec; v. 42(6): p. 601-11.
- MARIANA JC, MONNIAUX D, DRIANCOURT MA MAULEN P, 1991. Folliculogenesis. In: **Cupps PT** (ed.), *Reproduction in Domestic Animals*, 4th edn. Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanivich, San Diego, CA, USA, pp. 119-171.
- MARTINS AC, RAMOS AF, MOLLO MR, PIVATO I, CAMARA JU, CARRIJO LHD, DRIESSEN K, RUMPF R, SARTORI R, 2006. Influência da alta ou baixa ingestão alimentar na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Acta Sci Vet** 34(supl);290;Resumo.
- MARTINS CM, 2005. Adequação do protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus*. In: **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo, SP.
- MCEVOY TG, ROBINSON JJ, AITKEN RP, FINDLAY PA, PALMER RM, ROBERTSON IR, 1995. Dietary-induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent in vivo and in vitro development of their ova. **Anim. Reprod. Sci.** 39, 89-107.
- MONGET P E MARTIN GB, 1997. Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. **Human Reprod. Suppl.** 12, 33-52.
- MORRISON DG, SPITZER JC, PERKINS JL, 1999. Influence of prepartum body condition score change on reproduction in multiparous beefs cows calving in moderate body condition. **J. Anim. Sci.** 77: 1048-1054.

- MURPHY MG, ENRIGHT WJ, CROWE MA, MCCONNELL K, SPICER LJ, BOLAND MP, ROCHE JF, 1991. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle in beef heifers. **J. Reprod. Fertil.** 92:333-338.
- NASSER LF, ADAMS GP, BO GA, MAPLETOFT RJ, 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergency in heifers. **Theriogenology** 40, 713-724.
- NEBEL RL, JOBST SM, DRANSFIELD MBG, PANDOLFI SM, BAILEY TL, 1997. Use of a radiofrequency data communication system, Heat Watch, to describe behavioral estrus in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 80(suppl. 1):151(abstract).
- NEGRÃO S, NIBART M, HUMBLLOT P, 1997. Negative effects of overfeeding on superovulatory response and embryo production in dairy heifers. In: **Proc 13th Scient Meet AETE**, Lyon;Abstract.
- NOGUEIRA MFG, BARROS BJP, TEIXEIRA AB, TRINCA LA, D'OCCHIO MJ, BARROS CM, 2002. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. **Theriogenology** 57:1625-34.
- NOLAN R, O'CALLAGHAN D, DUBY RT, LONERGAN P, BOLAND MP, 1998. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. **Theriogenology** 50:1263-1274.
- O'CALLAGHAN D E BOLAND MP, 1999. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. **Anim. Sci.** 68, 299-314.
- PARR RA, DAVIS IF, FAIRCLOUGH RJ, MILES MA, 1987. Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. **J. Reprod. Fertil.** 80:317-20.
- PARR RA, DAVIS IF, MILES MA, SQUIRES TJ, 1993a. Feed-intake affects metabolic-clearance rate of progesterone in sheep. **Research in Veterinary Science** 55:306-310.
- PARR RA, DAVIS IF, MILES MA, SQUIRES TJ, 1993b. Liver blood-flow and metabolic-clearance rate of progesterone in sheep. **Research in Veterinary Science** 55:311-316.
- PELL JM E BATES PC, 1990. The nutritional regulation of growth hormone action. **Nutr. Res. Rev.** 3:163.
- PIERSON RA E GINTHER OJ, 1988. Ultrasonic-imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology** 29:21-37.
- PURWANTARA B, SCHMIDT M, GREVE T, CALLESEN H, 1993. Follicular dynamics prior to and during superovulation in heifers. **Theriogenology** 40, 913-921.
- REVAH I E BUTLER WR, 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **J. Reprod. Fertil.** 106:39-47.

- RHODES FM, ENTWISTLE KW, KINDER JE, 1996. Changes in ovarian function and gonadotropin secretion preceding the onset of nutritionally induced anestrus in *Bos indicus* heifers. **Biol. Reprod.** 55, 1437-1443.
- RHODES FM, FITZPATRICK LA, ENTWISTLE KW, DE'ATH G. 1995. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrous. **J. Reprod. Fertil.** v. 104, n. 1, p. 41-49.
- RICHARDS MW, WETTEMANN RP, SCHOENEMANN HM, 1989. Nutritional anestrus in beef cows: body weight change, body condition, luteinizing hormone in serum and ovarian activity. **J. Animal. Sci.** 67:1520-1526.
- ROBERSON MS, WOLFE MW, STUMPF TT, KITTOK RJ, KINDER JE, 1989. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biol. Reprod.** 41:997-1003.
- ROBINSON JJ, 1990. Nutrition in the reproduction of farm animals. **Nutr. Res. Rev.** 3, 253.
- ROCHE JF E BOLAND MP, 1991. Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 81-90.
- RYAN DP, SPOON RA, GRIFFITH MK, WILLIAMS GL, 1994. Ovarian follicular recruitment, granulosa cell steroidogenic potential and growth hormone/insulin-like growth factor – I relationship in sukler beef cows consuming high lipid diets: effect of graded differences in body condition maintained during the puerperium. **Dom. Anim. Endocrinol.** 11, 161-174.
- SANGSRITAVONG S, COMBS DK, SARTORI R, ARMENTANO LE, WILBANK MC, 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol 17 beta in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 85:2831-2842.
- SANTOS IW. Diagnóstico ginecológico bovino pela ultra-sonografia. In: **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Maria, RS. 1993, 59p.
- SARTORI R, FRICKE PM, FERREIRA JCP, GINTHER OJ, WILTBANK MC, 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biol. Reprod.** 65, 1403-1409.
- SARTORI R, HAUGHIAN J, ROSA GJM, SHAVER RD, WILTBANK MC, 2000. Differences between lactating cows and nulliparous heifers in follicular dynamics, luteal growth, and serum steroid concentrations. **J. Dairy Sci.** 83(suppl. 1):212 (abstact).
- SARTORI R, HAUGHIAN JM, SHAVER RD, ROSA GJM, WILTBANK MC, 2004. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **J. Dairy Sci.** 87: 905-920.
- SARTORI R, ROSA GJM, WILTBANK MC, 2002a. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J. Dairy Sci.** 85: 2813-2822.

- SARTORI R, SARTOR-BERGFELT R, MERTENS SA, GUENTHER JN, PARRISH JJ, WILTBANK MC, 2002b. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J. Dairy Sci.** 85: 2803-2812.
- SARTORI R, SUAREZ-FERNANDEZ CA, MONSON RL, GUENTHER JN, ROSA GJM, WILTBANK MC, 2003. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, v.60, n.7, p.1319 – 1330.
- SAVIO JD, KEENAN L, BOLAND MP, ROCHE JF, 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v.83, n. 2, p. 663-671.
- SELK GE, WETTEMANN RP, LUSBY KS, OLTJEN JW, MOBLEY SL, RASBY RJ, GARMENDIA JC, 1988. Relationships among weight change, body condition and reproductive performance of range beef cows. **J. Anim. Sci.** 66:3153-3159.
- SENGER PL, 1994. The estrus detection problem – new concepts, technologies, and possibilities. **J. Dairy Sci.** 77:2745-2753.
- SIDDIQUI MAR, SHAMSUDDIN M, BHUIYAN MMU, AKBAR MA, KAMARUDDIN KM, 2002. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. **Reprod. Dom. Anim.** 37, 37-41.
- SIROIS J E FORTUNE JE, 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous-cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biol. Reprod.** 39:308-317.
- SOLDANI R, CAGNACCI A, PAOLETTI AM, YEN SS, MELIS GB, 1995. Modulation of anterior pituitary LH response to GnRH by IGF-I in vitro. **Fertil. Steril.** 64:634-637.
- SPICER LJ, CHAMBERLAIN CS, 1998. Influence of cortisol on insulin- and insulin-like growth factor I (IGF-I)-induced steroid production and on IGF-I receptors in cultured bovine granulosa cells and thecal cells. **Endocrine** 9:153-161.
- SPICER LJ, TUCKER WB, ADAMS GD, 1990. Insulin-like growth factor-I in dairy cows – relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrous behavior. **J. Dairy Sci.** 73:929-937.
- STEWART RE, SPICER LJ, HAMILTON TD, KEEFER BE, 1995. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. **J. Anim. Sci.** 73:3719-3731.
- STRINGFELLOW DA e SEIDEL SM (ed.), 1999. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3ª edição. Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões. Biblioteca do Congresso.
- TAYLOR C E RAJAMAHEDRAN R, 1991. Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 71, n. 1, p. 61-68.

- THISSEN JP, KETELSLEGERS JM, UNDERWOOD LE, 1994. Nutritional regulation of the insulin-like growth factor. **Endocr. Rev.** 15:80.
- TOWNSON DH, TSANG PCW, BUTLER WR, FRAJBLAT M, GRIEL LC, JOHNSON CJ, MILVAE RA, NIKSIC GM, PATE JL, 2002. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. **J. Anim. Sci.** 80:1053-1058.
- VASCONCELOS JLM, BUNGERT KA, TSAI SJ, WECHSLER FS, WILTBANK MC, 1998. Acute reduction in serum progesterone concentrations due to feed intake in pregnant lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 81(suppl. 1):226(abstract).
- VASCONCELOS JLM, SANGSRITAVONG S, TSAI SJ, WILTBANK MC, 2003. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. **Theriogenology** 60:795-807.
- VASCONCELOS JLM, SARTORI R, OLIVEIRA HM, GUENTHER HG, WILTBANK MC, 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology** 56:307-314.
- VASCONCELOS JLM, SILCOX RW, ROSA GJM, PURSLEY JR, WILTBANK MC, 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and conception rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology** 52:1067-1078.
- VIANA JHM, FERREIRA AM, FERREIRA DE SÁ W, CAMARGO LSA, 2000. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 35, n. 12, p. 2501-2509.
- WADE GN E SCHNEIDER JE, 1992. Metabolic fuels and reproduction in female mammals. **Neurosci. Biobehavioral Rev.** 16, 235.
- WEBB R, GARNSWORTHY PC, GONG JG, ARMSTRONG DG, 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **J. Anim. Sci.** v.82, E63-E74.
- WEHRMAN ME, ROBERSON MS, CUPP AS, KOJIMA FN, STUMPF TT, WERTH LA, WOLFE MW, KITTOCK RJ, KINDER JE, 1993. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 β -estradiol and increases conception in cows. **Biol. Reprod.** 49:214-220.
- WILLIAMS SA, YAAKUB H, O'CALLAGHAN D, BOLAND MP, SCARAMUZZI RJ, 1997. Effect of energy intake from diet or infusion of glucose on ovulation rate in ewes. **J. Reprod. Fertil.** Abstract Series 19, 57 (Abstract).
- WILSON ME, 1995. IGF-I administration advances the decrease in hypersensitivity to estradiol negative feedback inhibition of serum LH in adolescent female rhesus monkeys. **J. Endocrinol.** 145; 121-130.
- WILTBANK MC, FRICKE PM, Sangsritavong S, Sartori R, Ginther OJ, 2000. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 83:2998-3007.

- WILTBANK MC, GÜMEN A, SARTORI R, 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology** 57:21-52.
- WOLFENSON D, INBAR G, ROTH Z, KAIM M, BLOCH A, BRAW-TAL R, 2004. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology** 62:1042-1055.
- WRENZYCKI C, DE SOUZA P, OVERSTROM EW, DUBY RT, HERRMANN D, WATSON AJ, NIEMANN H, O'CALLAGHAN D, BOLAND MP, 2000. Effects of superovulated heifer diet type and quantity on relative mRNA abundances and pyruvate metabolism in recovered embryos. **J. Reprod. Fertil.** 18:69-78.
- XU ZZ, BURTON LJ, MACMILLAN KL, 1997. Reproductive performance of lactating dairy cows following estrus synchronization regimens with PGF_{2α} and progesterone. **Theriogenology** 47:687-701.
- XU ZZ, GARVERICK HA, SMITH GW, SMITH MF, HAMILTON SA, YOUNGQUIST RS, 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biol. Reprod.** 53:951-957.
- YAAKUB H, O'CALLAGHAN D, BOLAND MP, 1999. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. **Theriogenology** 51, 1259-1266.
- YAAKUB H, O'CALLAGHAN D, DUFFY P, DUBY RT, BOLAND MP, 1996. Effect of concentrate type and quantity on superovulation in cattle. **Proc. Tech. Gamete Manip. Stor.** 37 (Abstract).