

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ELIZABETH SARAIVA PEIXOTO PINHEIRO

INFLUÊNCIA DA INSULINA EXÓGENA EM DOSES DIFERENTES
SOBRE OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE CABRAS NULÍPARAS
DA RAÇA ANGLO-NUBIANA

FORTALEZA-CE
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ELIZABETH SARAIVA PEIXOTO PINHEIRO

INFLUÊNCIA DA INSULINA EXÓGENA EM DIFERENTES DOSES
SOBRE OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE CABRAS NULÍPARAS
DA RAÇA ANGLO-NUBIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de pequenos ruminantes.

Orientador (a): Prof. Dr. Davide Rondina

FORTALEZA-CE

2008

ELIZABETH SARAIVA PEIXOTO PINHEIRO

INFLUÊNCIA DA INSULINA EXÓGENA EM DOSES DIFERENTES
SOBRE OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE CABRAS NULÍPARAS
DA RAÇA ANGLO-NUBIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Dr. Davide Rondina
Orientador – UECE

Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas
Examinador-UECE

Dr. Ailton Alencar de Araújo
Examinador-UECE

Dra Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley
Examinadora – UECE

Aos meus pais (Rosa Pinheiro e Raimundo Saraiva), motivo maior da minha caminhada.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte da minha força e esperança, pela proteção que me tem concedido durante minha vida e por não me abandonar nas horas mais difíceis, me mostrando que sempre posso ir a Ele, pois sou sua ovelha, mesmo desgarrada.

Agradeço aos meus familiares, em especial meus pais, Rosa Pinheiro e Raimundo Saraiva, que mesmo nos piores momentos de nossas vidas sempre me mostraram o caminho mais certo a ser seguido e a esperança por dias melhores. Amo vocês mais que tudo e me orgulho de tê-los como meus pais. E ao meu querido irmão, Wellington Saraiva, pela amizade e pelo carinho.

Agradeço ao Prof^o. Davide Rondina por sua orientação segura, por sua amizade, dedicação, por ter sido sempre sincero em nossas conversas. Muito obrigada pelo apoio e pelos ensinamentos a mim concedidos na execução do projeto e durante esses quatro anos de vida acadêmica-científica.

Agradeço ao Prof^o. José Vicente Figueirêdo Freitas, por sua co-orientação, por ter disponibilizado equipamentos e ter concedido parte da ração dos animais, sendo essencial para a execução do experimento. Obrigada, por todas as sugestões e por sua atenção.

Agradeço aos amigos e parceiros, Aline Lima de Souza, Karlliely de Castro Almeida e Francisco Carlos de Sousa pela colaboração inestimável durante a execução do experimento, por terem disponibilizado o seu tempo para estarem na cidade de Tauá, durante a realização do mesmo, sacrificando momentos importantes ao lado da família e pelos momentos de descontração. Obrigada pelo apoio e amizade.

Agradeço à família Câmara, em especial ao Sr. Antônio Câmara e a Sra Gorete por terem concedido a estrutura, os animais e também recursos humanos, permitindo a concretização deste trabalho, enfim pelo apoio e dedicação durante todo o experimento. Muito obrigada pelo carinho e por se mostrarem pessoas tão admiráveis e prestativas.

Agradeço aos funcionários da Fazenda Chapadinha, Zequinha, Meire e sua filha Fernanda, pela ajuda durante a estadia na fazenda, com os animais e com a casa. Muito obrigada pela ótima companhia e pela atenção.

Agradeço aos funcionários do setor de transporte que viajaram tantas vezes para Tauá, sempre dedicados e dispostos a ajudar.

Agradeço ao meu noivo, Dárcio Ítalo Alves Teixeira, que se mostrou extremamente disponível a me ajudar em todos os momentos dessa fase, não sendo apenas um companheiro fiel, compreensivo e carinhoso, mas um orientador, um aluno e um amigo. Obrigada por seu

incentivo, principalmente nos momentos mais difíceis e por me proporcionar momentos felizes ao seu lado.

Agradeço à amiga, Alexsandra Fernandes, pela amizade, cumplicidade, atenção e pelos incentivos nos momentos mais desestimulantes do mestrado, enfim pelos sinceros sentimentos recíprocos.

Agradeço aos amigos que compõem o Laboratório de Nutrição e Produção de Ruminantes (LANUPRUMI), em especial as estudantes de pós-graduação, Iracelma Arruda, Isadora Machado, Liliane Silva e Magda Rodrigues; e aos estudantes de iniciação científica, Alana Gondino, Aline Maia, Lucas Diniz e César Carneiro, por me proporcionarem bons momentos nesse período que convivemos.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias que contribuíram para a minha formação, e pelos exemplos de professores e pesquisadores, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço à coordenação do PPGCV, em especial ao professor Marcos Fábio e as secretárias Adriana e Cristina, pela disponibilidade e colaboração, e por toda a ajuda prestada durante meu mestrado.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro durante a execução deste Projeto e durante todo o Mestrado Acadêmico.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Para comparar a resposta reprodutiva de cabras nulíparas submetidas a doses crescentes de insulina, 39 cabras da raça Anglo-nubiana tiveram seus estros sincronizados pelo uso de esponjas intravaginais contendo 60 mg de MAP (Progespon, Syntex, Argentina), por 10 dias associado a um tratamento luteolítico de 50 µg de cloprostenol (Ciosin, Coopers, Brasil), 48 h antes da remoção da esponja (RE). As cabras foram alocadas em três grupos: Insulina I ($n=13$), Insulina II ($n=13$) e Controle ($n=13$). No grupo Insulina I e II, todos os animais foram tratados subcutaneamente com insulina humana de longa duração com doses de 0,14 UI/kg PV/dia e 0,2 UI/kg PV/dia, respectivamente, durante três dias consecutivos, iniciando 48h antes da RE. Os animais do grupo Controle receberam 0,5 mL de solução salina. O estro foi monitorado três vezes ao dia e as fêmeas com estro evidente foram cobertas no início do estro e 24 h depois, utilizando três machos da mesma raça e de fertilidade comprovada. Com a ultra-sonografia transretal, através do uso do equipamento de ultra-som, Falco 100, acoplado a um transdutor de 6/8 MHz, foi monitorada a dinâmica do folículo ovulatório, iniciando 24 h após a RE até a ovulação e no 3º dia pós-monta foi determinada a taxa de ovulação, e ainda, foi realizado o diagnóstico de gestação aos 25, 35 e 45 dias. Durante o experimento, foram realizadas colheitas de sangue, iniciando 48 h antes da RE até o 12º dia de gestação, para a análise dos níveis de insulina e progesterona. A administração de insulina elevou os níveis plasmáticos da mesma ($P < 0,05$) nos animais tratados, contudo não foi encontrado nenhum efeito significativo ($P > 0,05$) entre os grupos sobre a resposta ao estro. O crescimento do folículo pré-ovulatório indicou um efeito significativo do tratamento da insulina ($p < 0,05$). Além disso, as cabras submetidas à administração de insulina exibiram uma melhor resposta ovariana ($p < 0,05$) quando comparada com as cabras não tratadas ($1,70 \pm 0,23$ vs. $1,00 \pm 0,21$). O grupo Insulina 0,14UI exibiu um maior diâmetro do CL ($p < 0,05$) e 50% das ovulações ocorreram as 36h do IE ($p < 0,05$). Nos grupos Insulina foram observadas uma maior frequência de perdas embrionárias até o 12º dia de gestação, contudo estas reduziram significativamente ($p < 0,05$) com o decorrer da gestação, enquanto que no grupo controle as perdas se mantiveram similares entre os intervalos. A prolificidade foi similar entre os grupos Insulina 0,14 UI ($1,50 \pm 0,22$), Insulina 0,2 UI ($1,14 \pm 0,14$) e Controle ($1,20 \pm 0,20$) ($p > 0,05$). Os resultados indicam que existe um efeito benéfico da insulina sobre a resposta ovariana e fertilidade de cabras nulíparas da arca Anglo-nubiana.

Palavras-chave: Resposta reprodutiva. Cabras. Nulíparas. Insulina.

ABSTRACT

Thirty-nine nulliparous and cyclic Anglo-nubian goats were synchronized using 60 mg MPA (Progespon, Syntex, Argentina) vaginal sponge for 10 days associated with an luteolytic treatment 50 µg cloprostenol, 48 h before sponge removal (SR). Goats were allocated in three groups: Insulin I (n=13), Insulin II (n=13) and Control (n=13). In Insulin I and II groups, all animals were treated subcutaneously with 0.14 IU/kg BW/day and 0.2 IU/kg BW/day human long acting insulin, respectively, during three consecutive days beginning 48h before SR. In control group saline solution was administrated. The goats were monitored three times a day for the occurrence of estrous and mated at onset of estrous and again 24 h later, using three Anglonubian bucks of confirmed fertility. Transrectal ultrasonography of ovaries was performed for monitoring ovulatory follicle dynamics and ovulation rate. The growing of the ovulatory follicles were analyzed 24 h after SR until ovulation and the ovulation rate was determined 3 days after mating. The pregnancy detection was performed 25, 35 and 45 days after breeding by transrectal ultrasonography. Blood samples were collected from 48h before sponge removal to 12^o day of gestation for insulin and progesterone assay. Insulin administration showed a significant effect ($p < 0.05$) on insulineaemia changes, exhibiting a positive cumulative increasing of plasmatic insulin concentration. None evidence statistically significant ($p > 0.05$) was found on estrus responses between groups. The preovulatory follicle growing pattern indicated a significant effect of insulin treatment ($p < 0.05$). The insulin goats treated exhibit a higher ($p < 0.05$) mean ovulatory rate when compared to untreated goats (1.70 ± 0.23 pooled mean vs. 1.00 ± 0.21), and Insulin 0.14 UI group showed the higher CL size ($p < 0.05$) and more than 50% of ovulation was at 36 hours from OE ($p < 0.05$). In Insulin groups was observed the higher frequency of pregnancy loss before the 12 days after mating. However, during the gestational period, losses decrease significantly ($p < 0.05$) in these treatments, whereas in Untreated group pregnancy failure was maintained similar between intervals. At kidding, litter size was similar between Insulin 0.14 UI (1.50 ± 0.22), Insulin 0.2 UI (1.14 ± 0.14) and Untreated (1.20 ± 0.20) groups ($p > 0.05$). The results indicating that there is beneficial effect of insulin on ovarian response and fertility in nulliparous goats.

Keywords: Reproductive response. Goats. Nulliparous. Insulin.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1	Efeitos da nutrição sobre a taxa de ovulação em ovelhas. Fonte: Scaramuzzi <i>et al.</i> (2006).....	18
Figura 2 -	Modelo da regulação nutricional da foliculogênese e taxa de ovulação em ovelhas. Fonte: Scaramuzzi <i>et al.</i> (2006).....	19
Figura 3 -	Efeito do padrão de desenvolvimento folicular sobre a fertilidade em vacas. Fonte: Iskeep (2004).....	28
Figura 4 -	Relação entre as concentrações de progesterona plasmática no dia 7 após a inseminação artificial e subsequente taxa de sobrevivência embrionária em novilhas. Fonte: Diskin <i>et al.</i> (2004).....	29
Figura 5 -	Trajetória do crescimento fetal e placentário em ovelha prenhe. Fonte: Redmer <i>et al.</i> (2004).....	35

Capítulo 2

Figura 1 -	Mean cumulative changes of Insulin levels according to the estrus synchronization treatment and mating of nulliparous goats untreated or treated with increasing doses of insulin. Statistically significant ($p < 0.05$) effect of Insulin treatment is given in the figure. Values are means \pm SEM.....	65
Figura 2 -	Ovulatory follicle size (mm) and number of ovulation according to the time from estrus onset (hours) in nulliparous goats untreated or treated with increasing doses of insulin ($n = 15$). a,b $p < 0.05$ comparison between groups. For preovulatory follicle, values are expressed as mean \pm SEM and statistically significant ($p < 0.05$) effect of Insulin treatment is given in the figure.....	67
Figura 3 -	Progesterone levels in pregnant nulliparous does untreated or treated with increasing doses of insulin, progesterone levels in animals that presented pregnancy loss $>$ or $<$ 12 days after mating. Pregnancy loss (%) (Right) according to the days after mating. Statistically significant ($p < 0.05$) effect of Insulin treatment is given in the figure. For progesterone concentration, values are expressed as mean \pm SEM.....	68

LISTA DE FOTOS

Painel 1 - Registro das etapas do experimento: (A) Seleção das fêmeas, (B) Colocação das esponjas intravaginais, (C) Detecção do estro e cobertura, (D) Colheita de sangue.....	89
--	----

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1 -	Efeito do tratamento nutricional antes e após a inseminação artificial sobre a taxa de sobrevivência embrionária em novilhas. Fonte: Dunne <i>et al.</i> (1999).....	32
Tabela 2 -	Nutrientes fetais do sangue arterial e concentração de hormônios metabólicos em fetos com crescimento reduzido e normal de ovelhas submetidas a um alto e moderado consumo alimentar, respectivamente. Fonte: Wallace <i>et al.</i> (2002; 2000).....	37

Capítulo 2

Tabela 1-	Estrus and ovarian responses in nulliparous does untreated or treated with increasing doses of insulin. Values are given as mean \pm SEM.....	66
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE	Colocação da esponja
CL	Corpo lúteo
dL	Decilitro
E2	17 β -estradiol
eCG	Gonadotrofina coriônica eqüina
E.P	Erro padrão
FD	Folículo dominante
Fig.	Figura
FPO	Folículo pré-ovulatório
FSH	Hormônio folículo estimulante
GH	Hormônio do crescimento
GLUTs (1 e 4)	Transportadores de glicose, tipo 1 e 4
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
H	Hora
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE	Início do estro
IGF-1	Fator de crescimento semelhantes à insulina, tipo 1
IGFBP	Proteína de ligação de IGF
IFN- τ	Interferon τ
i.m	Intra-muscular
kg	Kilograma
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
M	Manutenção
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
Mm	Milímetro
μ g	Micrograma

N	Número
NPY	Neuropeptídeo Y
P	Probabilidade
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α} .
PV	Peso vivo
%	Porcentagem
RE	Retirada da esponja
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
UI	Unidades internacionais

SUMÁRIO

RESUMO	07
LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE FOTOS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS	12
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Estado nutricional e atividade ovariana em ruminantes	16
2.1.1. Efeito da nutrição sobre o desenvolvimento folicular e subsequente ovulação	17
2.1.2. Sistemas hormonais metabólicos como intermediadores nutricionais sobre a Função ovariana	18
A. Sistema insulina-glicose	20
A.1. Insulina	20
A.2. Glicose	22
B. Sistema IGF-1	22
C. Sistema Leptina	24
2.2. Fatores que afetam o desenvolvimento embrionário e subsequente fertilidade em ruminantes.	25
2.2.1. Principais causas endógenas relacionados à mortalidade embrionária e baixa ilidade.	25
2.2.2. Efeito da nutrição sobre a sobrevivência embrionária	30
2.3. Influência do crescimento placentário e do estado nutricional materno sobre o crescimento fetal	35
3. JUSTIFICATIVA	38
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA	39
5. OBJETIVOS	40
6. CAPÍTULO 1	41
7. CAPÍTULO 2	45
8. CONCLUSÕES	69
9. PERSPECTIVAS	70
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
11. ANEXO	89

1 INTRODUÇÃO

A criação de pequenos ruminantes, sobretudo da espécie caprina, na região Nordeste do Brasil é de extrema importância econômica e destaca-se pelo seu efetivo de, aproximadamente, 10,4 milhões de animais, o que corresponde a 88% do rebanho nacional (IBGE,2007). Nesse contexto, fazendas de elevado nível técnico têm buscado utilizar animais cada vez mais jovens nas estações reprodutivas com a finalidade de alcançar um maior aproveitamento na produtividade do rebanho. No entanto, as fêmeas nulíparas apresentam, com bastante frequência, problemas inerentes ao início da sua ciclicidade, tais como o baixo índice de fertilidade, como resultado de uma nutrição deficiente ou de uma baixa oferta de alimentos, devido às difíceis condições ambientais (DELGADILLO e MALPAUX, 1996).

Em ruminantes, a nutrição influencia a fertilidade através do fornecimento de nutrientes específicos que são necessários para os processos de desenvolvimento do oócito, ovulação, fecundação, sobrevivência embrionária e o estabelecimento da gestação e ainda, através da sua influência nas concentrações circulantes dos hormônios e outros metabólitos sensíveis aos nutrientes requeridos para o sucesso destes processos (ROBINSON *et al.*, 2006). Dessa forma, o potencial reprodutivo é influenciado pela nutrição a curto e a longo prazo, no estro e durante os diferentes estádios fisiológicos, quando a fertilidade nos animais pode ser fortemente condicionada.

O melhoramento dos parâmetros reprodutivos através da nutrição tem se destacado como uma importante ferramenta, especialmente por caracterizar-se como de baixo custo no controle da taxa de ovulação e do tamanho da prole, em sistemas de produção extensivos e em ambientes como o semi-árido (MARTIN *et al.*, 2004). Em espécies domésticas, estudos têm verificado a administração da insulina nas diferentes fases reprodutivas como moduladora das funções reprodutivas, aumentando os níveis intra-foliculares e periféricos de fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I). Além disso, em suínos e bovinos, a insulina aumenta o recrutamento de folículos responsivos as gonadotrofinas, reduz a atresia folicular e atua como um sinal metabólico, influenciando a liberação de LH pela hipófise anterior (MATAMOROS *et al.*, 1991; MONGET & MARTIN, 1997). Em ovinos, tem sido demonstrado que as populações foliculares são sensíveis ao incremento nutricional, apresentando um efeito positivo sobre a foliculogênese e a taxa de ovulação (WHITLEY *et al.*, 2000). Contudo, dados na literatura que relatam a influência nutricional a curto prazo, especialmente no que se refere à administração de insulina exógena sobre a fertilidade de cabras nulíparas e em crescimento ainda são escassos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estado nutricional e atividade ovariana em ruminantes.

A atividade ovariana nos animais domésticos é influenciada pelos níveis nutricionais em vários estádios dos processos reprodutivos, da maturidade à receptividade sexual, prenhez e lactação. Os potenciais locais de ação da nutrição sobre a função ovariana incluem efeitos sistêmicos : (i) hipotalâmicos, através da síntese e liberação de GnRH; (ii) a hipofisários, lobo anterior, através do controle da síntese e liberação de FSH, LH e hormônio de crescimento (GH); e (iii) ovarianos, por regulação do crescimento folicular e síntese de esteróides. Adicionalmente, existem possíveis sítios locais de ação por consequência da cascata de fatores de crescimento e suas proteínas ligantes dentro do ovário. Além disso, um grande número de fatores metabólicos estão envolvidos na regulação da função ovariana. Estes incluem hormônios e fatores de crescimento, como insulina, glucagon, leptina, GH, hormônios tireoidianos, IGF hepático e suas proteínas ligantes, bem como os seguintes combustíveis metabólicos: glicose, ácidos graxos, lipoproteínas de baixa e alta densidade (LDL e HDL, respectivamente), T3 (Triiodotironina) e T4 (Tiroxina) (ROCHE & DISKIN, 1994).

Vários estudos têm verificado a relação entre a nutrição e a reprodução, através dos estados metabólicos resultantes da variação do balanço energético. Esses estados são regulados por meio de interações complexas entre as concentrações sanguíneas de hormônios metabólicos e de nutrientes. Além disso, muitos desses hormônios metabólicos, envolvidos na homeostase de nutrientes no organismo, também afetam o sistema reprodutivo. Rapidamente, quando o consumo alimentar não é capaz de satisfazer as exigências nutricionais do animal, o organismo disponibiliza a energia armazenada na forma de glicogênio, triglicerídeos e proteína, resultando num *déficit*, caracterizando o balanço energético negativo. Por outro lado, quando o consumo de nutrientes é maior que as exigências nutricionais, os nutrientes em excesso são armazenados ou eliminados na forma de calor metabólico. Nesse caso, o estado metabólico é caracterizado pelo balanço energético positivo (SCARAMUZZI *et al.*, 2006).

Os efeitos do balanço energético negativo sobre a reprodução atuam ao nível hipotalâmico-hipofisário (WADE & JONES, 2005), inibindo a secreção de GnRH, resultando em ausência de grandes pulsos de LH e baixas concentrações de FSH e, ainda, é caracterizado pelo aumento da sensibilidade do *feedback* negativo, baixa produção de estradiol e inibição da foliculogênese. Tais mudanças estão associadas à anovulação, anestro e ao atraso na puberdade de fêmeas. Esse estado metabólico apresenta, ainda, um quadro de hipoglicemia, hipoinsulinemia, supressão do IGF-I plasmático e elevação das concentrações plasmáticas do hormônio de crescimento (GH). Em vacas de leite lactantes, por exemplo, o balanço energético negativo apresenta efeitos inibitórios diretos sobre a foliculogênese e a qualidade oocitária (GONG, 2002; WATHES *et al.*, 2003).

Já o balanço energético positivo estimula o aumento da disponibilidade de glicose no tecido ovariano e das concentrações sanguíneas de leptina e insulina. Em ovinos, essas mudanças parecem afetar diretamente o ovário, pois são observadas a elevação das concentrações de FSH e a redução do *feedback* negativo, resultando no aumento da foliculogênese e da taxa de ovulação, bem como no avanço na puberdade. Além disso, o balanço energético positivo está associado com alterações no metabolismo hepático de esteróides (PARR *et al.*, 1987; 1993), podendo alterar o *feedback* negativo entre o ovário e o sistema hipotalâmico-hipofisário, de modo a incrementar a foliculogênese.

2.1.1 Efeito da nutrição sobre o desenvolvimento folicular e subsequente ovulação.

Em ruminantes, as populações de folículos ovarianos são muito sensíveis à manipulação nutricional, podendo esta ferramenta ser utilizada a fim de incrementar prontamente a foliculogênese e a taxa de ovulação. Sabe-se que o aumento do peso corpóreo é inevitável durante um balanço energético positivo prolongado, porém, o efeito estimulatório da nutrição sobre a foliculogênese pode acontecer antes de qualquer aumento detectável do peso corpóreo. Assim, Scaramuzzi *et al.* (2006) sugeriram uma classificação dos efeitos nutricionais sobre a taxa de ovulação a partir de uma análise descritiva dos efeitos da nutrição e do peso corpóreo: efeito agudo, efeito dinâmico e efeito estático (Fig. 1). O efeito agudo da nutrição ocorre quando há um aumento na taxa de ovulação na ausência de uma mudança detectável no peso corpóreo do animal; o efeito dinâmico, por sua vez, é identificado por um aumento na resposta ovariana concomitante com o aumento crescente do peso corpóreo e, por último, o efeito estático nutricional onde é observada uma resposta ovariana em animais com um elevado e estável peso corpóreo (SCARAMUZZI *et al.*, 2006).

Em ovelhas, a taxa de ovulação é particularmente sensível ao fornecimento de nutrientes cerca de 6 meses antes da monta, quando os folículos ovarianos emergem do *pool* de folículos primordiais e têm seu crescimento comprometido. Neste momento, a subnutrição reduz o número de folículos que emergem, e conseqüentemente o número que estará disponível para ovulação (VIÑOLES, 2003).

Estudos recentes verificaram que a redução da taxa de ovulação pode ser evitada através do incremento nutricional (*flushing*) no período de 10 dias antes da monta. De fato, o período crítico para que ocorra um efeito estimulatório nutricional pode ser menor que 10 dias. Assim, Viñoles (2003) concluiu que seu efeito benéfico pode estar relacionado a um curto período de 8 a 4 dias antes da ovulação (Dias 10 a 14 do ciclo estral), coincidindo com o aparecimento da onda folicular ovulatória. Porém, a variação do momento da monta, que ocorre em fêmeas que ovulam espontaneamente, faz com que todas as ovelhas recebam o estímulo nutricional em um período iniciado 10 dias antes da introdução dos carneiros no rebanho. Em adição, suplementos dietéticos contendo altos níveis de energia e proteínas (DOWNING & SCARAMUZZI, 1997), bem como a infusão de glicose

(DOWNING *et al.*, 1995; WILLIAMS *et al.*, 1997) demonstraram elevar a taxa de ovulação em ovelhas, confirmando a hipótese de que uma suplementação energética por um curto prazo está envolvida diretamente no recrutamento e no crescimento folicular.

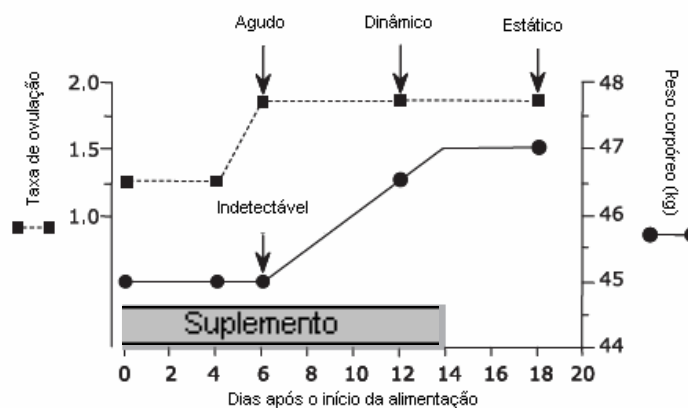


Figura 1: Efeitos da nutrição sobre a taxa de ovulação em ovelhas. Fonte: Scaramuzzi *et al.* (2006).

Além disso, estudos têm verificado que a nutrição também afeta a duração da onda de desenvolvimento folicular através de alterações fisiológicas no sistema de *feedback* negativo. Em caprinos, uma onda de crescimento folicular envolve o recrutamento de um grupo de pequenos folículos antrais durante um período que pode demandar mais de 24 horas, sendo que posteriormente um ou dois folículos serão selecionados para continuar a crescer até atingir o tamanho equivalente ao estágio pré-ovulatório. Teoricamente, a suplementação nutricional prolonga a onda folicular ao suprimir a secreção de estradiol do folículo dominante, conseqüentemente, levando ao declínio de FSH, e desacelerando o desenvolvimento normal da fase folicular, permitindo que a mesma se mantenha por um período mais longo e que folículos adicionais sobrevivam (SCARAMUZZI *et al.*, 2006). Em ovinos (VIÑOLES, 2003; VIÑOLES *et al.*, 2005) e bovinos (MURPHY *et al.*, 1991), o efeito da subnutrição encurtou o comprimento da onda folicular e o incremento nutricional obteve efeito inverso.

2.1.2 Sistemas hormonais metabólicos como intermediadores nutricionais sobre a função ovariana.

Vários estudos buscam compreender os mecanismos que ligam a nutrição à função ovariana. Há evidências de que os hormônios e produtos metabólicos tais como o GH, insulina, IGF-I, leptina e glicose apresentam papéis importantes no controle do desenvolvimento folicular, sendo,

provavelmente, mediadores dos efeitos da ingestão dietética sobre a taxa de ovulação e fertilidade (MUÑOZ-GUTIERREZ *et al.*, 2002; DISKIN *et al.*, 2003).

Scaramuzzi *et al* (2006), apoiados em uma forte evidência *in vivo* (MUÑOZ-GUTIÉRREZ *et al*, 2005; KENDALL *et al.*, 2004), propuseram um modelo em que a principal ação da nutrição no ovário é a inibição direta da secreção de estradiol folicular, através de pelo menos 3 sistemas metabólicos: insulina-glicose, leptina e IGF (Fig. 2). A supressão nutricional da secreção de estradiol, resultante da ação desses três sistemas metabólicos, conduz a aumentos compensatórios na secreção de FSH que estimulam a foliculogênese, aumentando o número de folículos disponíveis para a ovulação. Em ovelhas submetidas à infusão de glicose e à alimentação com suplemento de grãos de lupin, a secreção de estradiol foi suprimida durante a fase folicular do ciclo estral. Este fato parece ser resultante de um efeito direto sobre o folículo porque ocorre na presença de uma inalteração ou de um rápido aumento nas concentrações de FSH (SCARAMUZZI *et al.*, 2006).

Além disso, os três sistemas metabólicos possuem ações intra-foliculares em resposta ao efeito agudo da nutrição. Contudo o sistema leptina é o principal intermediador da modulação dos efeitos estático e dinâmico, apesar de não ser descartado, definitivamente, os sistemas insulina-glicose ou o sistema IGF dos efeitos estático e dinâmico. Assim, os sistemas insulina-glicose, IGF e leptina vêm se destacando como fortes intermediadores entre os efeitos nutricionais e a função ovariana, embora os mecanismos intra-folicular e intracelular dos efeitos desses sistemas sejam ainda desconhecidos (SCARAMUZZI *et al.*, 2006).

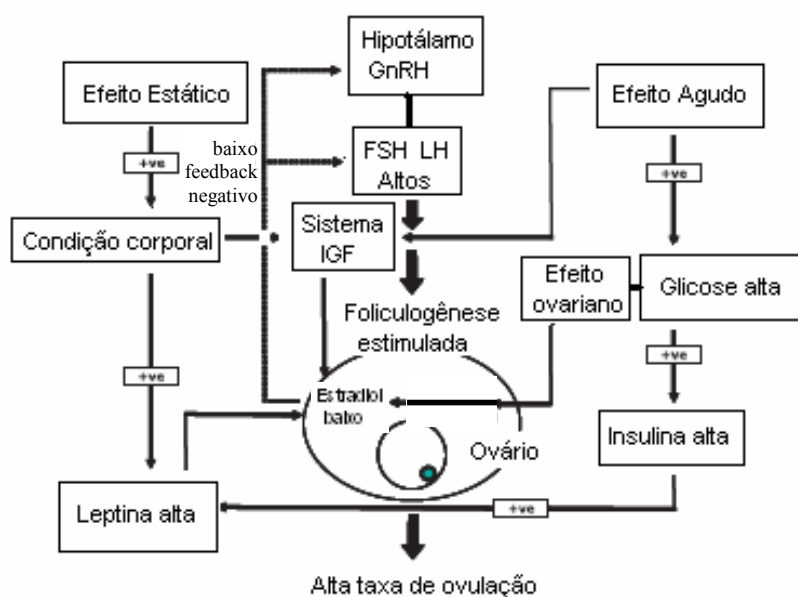


Figura 2: Modelo da regulação nutricional da foliculogênese e taxa de ovulação em ovelhas.

Fonte: Scaramuzzi *et al.* (2006).

A Sistema Insulina-glicose

O sistema intra-folicular insulina-glicose é estimulado através de tratamentos nutricionais, tendo como resposta um aumento da expressão de proteínas, GLUT-1 e GLUT-4, nas células da granulosa e da teca (WILLIAMS *et al.*, 2001) e de glicose no ovário (SCARAMUZZI *et al.*, 2002).

A.1 Insulina

Dentre outras funções, estudos apontam a insulina como uma importante moduladora das funções reprodutivas em rebanhos, atuando como um sinal metabólico que influencia a liberação do GnRH (ARIAS *et al.*, 1992), a pulsatilidade normal e a indução do pico de LH (KIRCHICK *et al.*, 1982; BULCHOLTZ *et al.*, 2000), exercendo, ainda, um papel regulador da responsividade ovariana as gonadotrofinas. Estudos têm mostrado que a capacidade do folículo dominante produzir estradiol, estimular um pico de LH e ovular é dependente, dentre outros fatores, das concentrações plasmáticas de insulina (JORRITSMA *et al.*, 2003; DISKIN *et al.*, 2006). A inabilidade para responder ao aumento da frequência do pulso de LH pode ser devida à ausência de receptores de LH nas células da granulosa que são conhecidos por serem dependentes das ações combinadas de FSH e 17 β -estradiol (WEBB *et al.*, 2004). O 17 β -estradiol folicular se torna dependente do estímulo do LH sobre a produção de andrógeno pelas células da teca e, aparentemente, pelo aumento de insulina e IGF-I (STEWART *et al.*, 1995). Desse modo, baixas concentrações plasmáticas de insulina poderiam reduzir a produção de andrógeno e estradiol e assim comprometer a habilidade dos folículos para adquirir receptores de LH.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que a insulina é um potente estimulador da diferenciação e estereoidogênese folicular (DISKIN *et al.*, 2003). De fato, trabalhos realizados com cultivos de células bovinas evidenciaram que a insulina estimula tanto a mitose quanto a produção de esteróides nas células da granulosa, da teca e nas células luteais (GUTIERREZ *et al.*, 1997; STEWART *et al.*, 1995; MAMLUK *et al.*, 1999). Armstrong *et al.* (2002b) verificaram que as células da granulosa bovina são extremamente dependentes da presença das concentrações fisiológicas de insulina, onde foi observado um aumento na produção de estradiol em pequenos folículos antrais (1 a 4 mm).

Além disso, pesquisas têm observado que a insulina aumenta as concentrações circulantes de IGF-I (MCGUIRE *et al.*, 1995) através do aumento da expressão hepática do mRNA para IGF-I. Por sua vez, as concentrações aumentadas de IGF-I podem estimular diretamente a proliferação ou a capacidade estereoidogênica das células da teca (SPICER e STEWART, 1996) e da granulosa (SPICER *et al.*, 1993) e ainda podem afetar diretamente a função pituitária (WILSON, 1995; SOLDANI *et al.*, 1995) e hipotalâmica (HINEY *et al.*, 1991). Assim, pode-se afirmar que a insulina possui uma ação direta e indireta sobre a função folicular.

Por outro lado, a aplicação direta da insulina, como moduladora das funções reprodutivas, é uma metodologia ainda em desenvolvimento. Em novilhas, a infusão de insulina aumentou tanto o diâmetro do folículo dominante (SIMPSON *et al.*, 1994) quanto a taxa de ovulação em animais sob restrição energética (HARRISON & RANDEL, 1986). Estudos observaram que búfalas com ovários inativos, quando submetidas a dietas com alta densidade energética, apresentaram um aumento nas concentrações de insulina sérica, sendo associado à melhoria da taxa de estro em resposta ao tratamento GNRH (BAKR e RAMOUN, 2000). Ramoun *et al.*, 2007, observando esta hipótese, conduziram um experimento com a finalidade de testar a administração de insulina antes do tratamento com GNRH sobre a resposta ovulatória de búfalas acíclicas. Nesse estudo, os autores verificaram que a administração de insulina (0,25 UI/ kg PV/dia por 3 dias consecutivos) induziu o aumento significativo ($P < 0,05$) do diâmetro dos grandes folículos ($6,85 \pm 0,64$ para $12,4 \pm 0,88$ mm). Além disso, houve um aumento significativo ($P < 0,01$) na taxa de indução do estro no grupo insulina-GNRH quando comparado ao grupo controle.

Em cabras, Selvaraju *et al.* (2003) verificaram uma melhor resposta ovariana total ($17,9 \pm 3,08$ CL) quando foi administrada insulina antes do tratamento de sincronização e de superovulação comparado ao grupo controle ($11,9 \pm 1,87$ CL). Sarath *et al.* (2007) conduziram um experimento submetendo cabras acíclicas à administração de insulina na dose de 0,2 UI/Kg PV/ dia por 5 dias consecutivos. Os animais tratados apresentaram significativamente um maior número total de folículos quando comparados com o grupo não-tratado. Além disso, nesse experimento nenhum animal do grupo controle apresentou sinais de estro, sendo que no grupo tratado foi verificada uma taxa de estro de 71,4%, com duração de $19,06 \pm 2,63$ h, e a taxa de ovulação foi de 80%. A média do diâmetro do corpo lúteo no grupo tratado atingiu cerca de 6,14 mm. Adicionalmente, foi observada uma alta e significativa concentração de 17β -estradiol nos dias 4 e 8 e de progesterona nos dias 12, 16 e 20. Esses dados estão de acordo com Khan *et al.* (2005), que verificaram que a administração subcutânea de insulina, na dose de 0,2 UI/Kg PV/dia por três dias consecutivos (dia 7, 8 e 9) do primeiro ciclo estral, aumentou significativamente a média do diâmetro dos grandes folículos no grupo tratado ($P < 0,05$). Ainda observaram que o diâmetro do corpo lúteo aumentou significativamente ($P < 0,01$) no dia 8 e no dia 13 do segundo ciclo, indicando o efeito da insulina sobre o desenvolvimento do corpo lúteo. Esses estudos indicam o efeito benéfico da insulina sobre a foliculogênese e a resposta ovariana.

Além disso, a insulina pode atuar benéficamente sobre o desenvolvimento embrionário e subsequente fertilidade. Estudos *in vitro* têm revelado que o desenvolvimento embrionário pode ser melhorado após a suplementação do meio de cultivo com insulina e IGF-I (BYRNE *et al.*, 2002; MAKAREVICH *et al.*, 2002; SIRISATHIEN *et al.*, 2003), visto que estes mediadores hormonais

reduzem a apoptose celular (AUGUSTIN *et al.*, 2003), bem como promovem um aumento da proliferação celular em blastocistos de vacas (BYRNE *et al.*, 2002 ; MAKAREVICH *et al.*, 2002).

Contudo, estudos têm relatado que dietas que promovem concentrações extremas de insulina plasmática podem ser prejudiciais para a qualidade do oócito (GARNSWORTHY *et al.*, 2008). Por exemplo, Faouladi-Nashta *et al.* (2005) verificaram que vacas alimentadas com esse tipo de dieta produziram significativamente um maior número de oócitos de baixa qualidade e uma menor proporção de embriões clivados que se desenvolveram até o estágio de blastocisto. Em outro experimento, Faouladi-Nashta *et al.* (2007) adicionando gordura a essa mesma dieta, observaram a redução das concentrações de insulina e uma melhoria na competência do desenvolvimento oocitário. Estes resultados indicam que a concentração extrema de insulina pode ter um efeito adverso sobre a qualidade do oócito, sendo consistente com outro estudo em vacas de corte (ADAMIÁK *et al.*, 2006).

Dessa forma, a insulina pode atuar tanto no controle dos estágios do desenvolvimento folicular independentes de gonadotrofinas, quanto em sinergia com gonadotrofinas para modular o recrutamento folicular, maturação de folículos pré-ovulatórios e o desenvolvimento embrionário.

A.2 Glicose

Evidências em várias espécies destacam a importância da glicose como um mediador dos efeitos nutricionais na reprodução. A disponibilidade de glicose influencia tanto o tônus quanto os modos da onda de secreção de LH, presumivelmente por seus efeitos sobre o GnRH. Em ovelhas, tornadas transitariamente hipoglicêmicas através de um tratamento com insulina, o início da onda de LH foi atrasado, mas a infusão de glicose associada à insulina preveniu a hipoglicemia e reestabeleceu o momento normal do pico de estrógeno, induzido pelo LH (MEDINA *et al.*, 1998). Segundo Foster e Nagatani (1999) a glicose pode ser um sinal metabólico que fornece informação para modular a secreção de GnRH, estando envolvida na liberação de LH.

O efeito reprodutivo da infusão de glicose é o de suprimir a secreção de estradiol na fase folicular, estimulando a foliculogênese e aumentando a taxa de ovulação (SCARAMUZZI *et al.*, 2006). Muñoz-Gutiérrez *et al.* (2002) verificaram que a infusão de glicose por 3 ou 5 dias estimulou a foliculogênese, aumentando o número de grandes folículos, sem apresentar efeito sobre os pequenos e médios folículos.

B Sistema IGF

Na maioria das espécies, o IGF-I é um estimulador potente da proliferação folicular, bem como da secreção de esteróides foliculares. Quando as concentrações sanguíneas de IGF-I estão baixas, por exemplo, durante o balanço energético negativo no pós-parto bovino, é observada a supressão da

foliculogênese e da secreção de esteróides (WATHES *et al.*, 2003; GONG, 2002; BEAM & BUTLER, 1999; BONDY *et al.*, 1993). Porém, quando as concentrações de IGF-I estão elevadas, a sua ação sobre o folículo deve ser controlada para prevenir uma possível hiperestimulação ovariana (CAMPBELL, 1988). Nesse caso, o IGF-I pode maximizar o crescimento folicular, sendo prejudicial para a maturação do oócito do folículo em crescimento (ARMSTRONG *et al.*, 2003). McCaffery *et al.* (2000) observaram que folículos tratados com altas concentrações de IGF-I tiveram oócitos significativamente menores, afetando a retomada da meiose, visto que esse processo é reiniciado quando o oócito atinge certo tamanho (AL-MUFTI *et al.*, 1988). Além disso, as vias do *feedback* negativo que controlam a secreção hepática de IGF-I não incluem o ovário, portanto a ação intra-folicular do IGF-I deve ser controlada localmente.

Nesse sentido, grandes mamíferos mono-ovulatórios, como a mulher, a ovelha e a vaca, não produzem quantidades significantivas de IGF-I intrafolicular (BONDY *et al.*, 1993; LEEUWENBERG *et al.*, 1995). A produção de IGF-I no folículo parece ser limitada aos pequenos mamíferos como roedores (HERNANDEZ, 1995) com ciclos estrais curtos, onde a ovulação é freqüente e a foliculogênese desenvolve-se rapidamente, ou ainda, em grandes mamíferos com altas taxas de ovulação, tais como a porca (SAMARAS *et al.*, 1993; ZHOU *et al.*, 1996). Em ovelhas, Scaramuzzi *et al.* (2006) sugerem que o efeito do incremento nutricional sobre o sistema IGF é de reduzir as ações foliculares do IGF-I, por intermédio das ações intra-foliculares do IGF-II e das Proteínas Ligantes aos Fatores de Crescimento Semelhante a Insulina (IGFBP) 2, 4 e 5, que agem para controlar a biodisponibilidade do IGF-I no folículo. A infusão de glicose e a suplementação com grãos de lupin, nessa espécie, aumentam a expressão da IGFBP2 e inibe a expressão de IGFI-R (MUÑOZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; MUÑOZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2004). Ambos os efeitos podem ajudar a reduzir a biodisponibilidade do IGF-I no folículo. Na espécie bovina, as IGFBPs são produzidas pelo oócito, folículo, corpo lúteo, oviduto, útero e embrião (MAKAREVICH *et al.*, 2002; GREVE *et al.*, 1995; SIMPSON *et al.*, 1994; ARMSTRONG *et al.*, 2002; VOGEL *et al.*, 2004).

As concentrações plasmáticas de IGF-I, em bovinos, estão provavelmente correlacionadas com as suas concentrações no fluido folicular de grandes folículos (ECHTERNKAMP, 1990). Nesta espécie, é bem documentado em estudos de cultivo *in vitro* (SPICER e STEWART, 1996; STEWART *et al.*, 1995) que o IGF-I induz a proliferação das células tecais e aumenta o número de sítios ligantes para o LH e este, por sua vez, aumenta a produção de progesterona e androsterona nas células da teca. Este fato sugere que o IGF-I tem um papel em aumentar a responsividade celular dos folículos ao LH que em troca aumentaria a produção de estradiol folicular, sendo este um pré-requisito para ovulação (DISKIN *et al.*, 2006).

Além disso, em vacas há uma aparente relação entre a atividade esteroidogênica do primeiro folículo dominante no pós-parto e as concentrações circulantes do IGF-I neste período. Sabe-se, ainda, que modificações nas concentrações sistêmicas de IGF-I após a parição estão diretamente relacionadas aos níveis plasmáticos de insulina, a qual funciona como um importante desencadeador da retomada da atividade ovariana (WEBB *et al.*, 2004).

Em adição, o IGF-I estimula a produção de progesterona luteal *in vitro* (SAUERWEIN *et al.*, 1992), visto que tem sido detectado receptores para este fator de crescimento no corpo lúteo bovino (WOAD *et al.*, 2000; NEUVIANS *et al.*, 2003). Contudo, a maioria do IGF-1 no corpo lúteo é proveniente da circulação (PERKS *et al.*, 1999), já que o ligante do IGF-I é produzido nesta estrutura (WOAD *et al.*, 2000; NEUVIANS *et al.*, 2003). Esta evidência indica que qualquer efeito benéfico do IGF-1 sobre o desenvolvimento do corpo lúteo e, conseqüentemente, sobre a produção de progesterona deve ser reflexo do IGF-I periférico (VELÁSQUEZ *et al.*, 2005).

Além disso, o receptor de IGF-I é expresso ao longo do embrião bovino durante o estágio de pré-implantação (YOSHIDA *et al.*, 1998; YASEEN *et al.*, 2001; LONERGAN *et al.*, 2003). E como previamente destacado, o IGF-I possui efeitos benéficos sobre a embriogênese, juntamente com a insulina, diminuindo o número de células apoptóticas e aumentando o número de células total do embrião (PRELLE *et al.*, 2001; BYRNE *et al.*, 2002; MAKAREVICH *et al.*, 2002; SIRISATHIEN *et al.*, 2003).

C Sistema Leptina

A leptina consiste em um outro mensageiro metabólico, sendo considerado um importante fator conectivo entre a reprodução e o estado metabólico animal. Em vacas, mudanças no balanço energético são refletidas em flutuações nas concentrações basais de leptina, levando a maiores concentrações deste hormônio nos casos de balanço energético positivo (BLOCK *et al.*, 2001). De acordo com Houseknecht *et al.* (1998), a insulina e os glicocorticóides estimulam o aumento das concentrações de leptina no sangue e diminuem a liberação do neuropeptídeo Y (NPY), o qual além de ser considerado um potente estimulador da ingestão alimentar, corresponde à conexão entre a leptina e os neurônios produtores de GnRH. Dessa forma, a leptina age centralmente no eixo hipotalâmico-hipofisário, através de seus receptores e do NPY, e periféricamente nas gônadas (WILLIANS *et al.*, 2002).

O sistema leptina foi identificado no folículo de ovelhas, através da detecção do mRNA do receptor para leptina (ObRb). Nesse estudo foi observado que em ambos os tratamentos alimentares com infusão de glicose e com suplementação de grãos de lupin houve um aumento no número de folículos com mRNA para ObRb (MUÑOZ-GUTIÉRREZ, 2005). Os efeitos da leptina sobre o folículo foram examinados por Muñoz-Gutiérrez *et al.* (2005) e Kendall *et al.* (2004), onde verificaram que a

leptina inibe a secreção *in vivo* de estradiol e estimula a foliculogênese, durante a fase folicular. Além disso, um imunizador passivo contra a leptina demonstrou um efeito oposto, aumentando a secreção de estradiol folicular *in vivo* durante a mesma fase do ciclo estral (KENDALL *et al.*, 2004). Vale ressaltar, que o efeito inibitório da leptina sobre a secreção de estradiol só foi verificado em baixas taxas de infusão (2 µg/h) e não em altas doses (20 µg/h) de leptina (KENDALL *et al.*, 2004).

2.2 Fatores que afetam o desenvolvimento embrionário e subsequente fertilidade em ruminantes.

O nascimento de crias vivas é a seqüência de eventos iniciados antes da fecundação com o desenvolvimento do oócito no ambiente folicular e finalizados com o embrião sinalizando sua presença. Neste momento, o útero deve estar pronto para permitir o processo de implantação e o estabelecimento da gestação. Em caprinos, embora a taxa de concepção, a qual é determinada pela presença de embriões clivados no oviduto, seja relativamente alta com uma média de 90–95% (COFFEY & BRITT, 1993), a taxa de mortalidade embrionária durante os primeiros 30 dias de gestação é de aproximadamente 40% (MARTINEZ *et al.*, 1998). Quinlivan *et al.* (1996) observaram que a maioria das mortes pré-natais em ovelhas ocorrem entre o 2° e 30° dia de gestação.

Neste contexto, diferentes fatores podem favorecer à mortalidade embrionária. Além de causas endógenas como a alteração da dinâmica do desenvolvimento folicular ou modificações na composição hormonal que conduzem a uma baixa qualidade do oócito, fatores externos, como a nutrição, podem modificar o ambiente folicular, bem como a qualidade do oócito, ou ainda criar um ambiente uterino hostil para o embrião (BILODEAU-GOESEELS & KASTELIC, 2003). Nesse sentido, se faz necessária a melhor compreensão da dinâmica e da regulação do crescimento folicular e função do corpo lúteo, além da ampliação do conhecimento sobre a relação entre a nutrição e a reprodução objetivando a disponibilização de regimes hormonais eficientes e taxas de gestação elevadas.

2.2.1 Principais causas endógenas relacionadas à mortalidade embrionária e baixa fertilidade.

As possíveis causas de perda embrionária e o momento que acontecem são ainda pouco conhecidas. Contudo, estão relacionadas com as baixas concentrações de progesterona circulante durante o ciclo imediatamente antes da monta, bem como no início da fase luteal do ciclo seguinte, resultando em modificações no desenvolvimento folicular e em um ambiente uterino inadequado para o desenvolvimento embrionário e assim o fracasso dos sistemas de reconhecimento materno da gestação (SPENCER *et al.*, 2004). A mortalidade embrionária pode ainda estar associada a presença de anormalidades no oócito ou no embrião.

Nas espécies bovina e ovina, estudos têm associado à redução da fertilidade as baixas doses de progesterona ou progestágenos utilizadas no tratamento de sincronização do estro (SAVIO *et al.*, 1993a; VIÑOLES *et al.*, 2001). Tal causa pode ser justificada em virtude do desenvolvimento e da ovulação de um folículo dominante, grande e persistente (SAVIO *et al.* 1993a). Nesse caso, o corpo lúteo que surge desses folículos produzem concentrações normais de progesterona, demonstrando que a baixa fertilidade não está relacionado à insuficiência luteal (STOCK e FORTUNE, 1993). Adicionalmente, tal ocorrência parece não afetar a função uterina, visto que a taxa de gestação após à transferência de embriões na presença ou na ausência de um folículo dominante persistente foi semelhante (WEHRMAN *et al.*, 1996).

Contudo, esses grandes folículos persistentes podem ocorrer, naturalmente, sob baixas concentrações de progesterona durante o ciclo estral imediatamente antes da monta, onde tem sido associada a um aumento na frequência dos pulsos de LH (BERGFELD *et al.*, 1996), o qual induz uma elevação na secreção de 17β -estradiol (SANCHEZ *et al.*, 1995), resultando em um ambiente endócrino anormal que afeta negativamente o desenvolvimento oocitário.

Vários estudos têm verificado que oócitos de folículos persistentes estão numa fase mais avançada de maturação nuclear, *in vivo*, que aqueles oriundos de folículos de idade e tamanho normal (REVAH e BUTLER, 1996; MIHM *et al.*, 1999). Isto ocorre, provavelmente, devido à exposição prolongada e a frequência aumentada do pulso de LH. Esses oócitos são fertilizáveis, porém o desenvolvimento do zigoto resultante é retardado, normalmente, ocorrendo morte embrionária antes de alcançar a fase de 16 células (AHMAD *et al.*, 1995). Mihm *et al.* (1999), promovendo a redução da progesterona circulante em vacas, obteve uma evidência de que 48 h após essa indução ocorrem mudanças na maturação do oócito, incluindo o avanço para fase nuclear II, irregularidade da membrana nuclear, degeneração das células do *cumulus* e mudanças na forma mitocondrial. Ainda nesse estudo, foi observado que em concentrações normais de progesterona essa mudança nuclear foi semelhante em oócitos de folículos dominantes durante as fases iniciais de atresia da primeira onda folicular. Vale ressaltar que a presença de um folículo persistente não altera o potencial de desenvolvimento de oócitos de folículos subsequentes, ou seja, caso o folículo persistente venha a regredir, é esperada a fertilidade normal na próxima ovulação (SMITH *et al.*, 1996).

Além de influenciar a persistência do folículo pré-ovulatório, os baixos níveis de progesterona também determinam o número de ondas de desenvolvimento folicular durante o ciclo estral (SANCHEZ *et al.*, 1995; SMITH e STEVENSON, 1995). Em vacas de leite lactantes, a taxa de concepção foi menor quando o folículo ovulatório surgiu da segunda onda de desenvolvimento folicular (58%, $n = 64$) quando comparada com o folículo originado na terceira onda (95%, $n = 21$) (INSKEEP, 2000). Townson *et al.*, (2002) também verificaram que a taxa de concepção para o

primeiro serviço foi menor em vacas de leite lactantes nas quais o folículo ovulatório surgiu da segunda onda (63%), comparada ao folículo da terceira onda de desenvolvimento folicular (81%) durante o ciclo estral antes da inseminação artificial. Adicionalmente, os autores observaram que vacas que ovularam o folículo dominante da segunda onda, apresentaram oócitos ovulatórios mais velhos em 1,5 dia e maiores em 1,2 mm. Ahmad *et al.* (1997) verificaram resultados semelhantes em vacas de corte. Alguns autores sugerem que esse fenômeno se deve a maior exposição dos oócitos pré-ovulatórios oriundos da segunda onda folicular em comparação com os da terceira onda, a altas concentrações de estradiol antes da estação de monta, comprometendo o desenvolvimento oocitário e por fim a sobrevivência embrionária (BILODEAU-GOESEELS & KASTELIC, 2003; ISKEEP, 2004).

Nesse contexto, estudos têm correlacionado a maior secreção de 17β -estradiol pelo folículo ovulatório antes da estação de monta com perdas embrionárias durante o 1° ao 4° dia após a monta, antes do embrião alcançar a fase de 16 células (MIHM *et al.*, 1999; REVAH e BUTLER, 1996). Breuel *et al.* (1993b) examinando a fertilidade no pós-parto de vacas de corte com fases luteais normais, após a indução do estro através do desmame, verificaram que os animais que apresentaram folículos pré-ovulatórios maiores no 5° dia antes da onda de LH tiveram maiores concentrações de estradiol pré-ovulatório e baixa taxa de concepção (36%) quando comparados com os animais que apresentaram folículos menores (91%). Contudo, a evidência de uma associação negativa entre as elevadas concentrações periféricas de estradiol no período peri-ovulatório e, subsequente, sobrevivência embrionária ainda é pouco conclusiva (ISKEEP, 2004).

Diante do exposto, pode-se sugerir que as mudanças que levam a redução nas taxas de sobrevivência embrionária podem iniciar muito cedo com a exposição a baixas concentrações de progesterona no ciclo precedendo ao estro, resultando na maturação prematura do oócito e, conseqüentemente, comprometendo a sua habilidade para continuar o desenvolvimento embrionário normal após a fertilização (ISKEEP, 2004). Assim, a relação seqüencial de baixas concentrações de progesterona durante o período pré-ovulatório até a ovulação de oócitos de idade variada, o aumento da freqüência de pulsos de LH e da secreção de 17β -estradiol é amplamente aceita como uma das causas da diminuição da fertilidade (Figura 3).

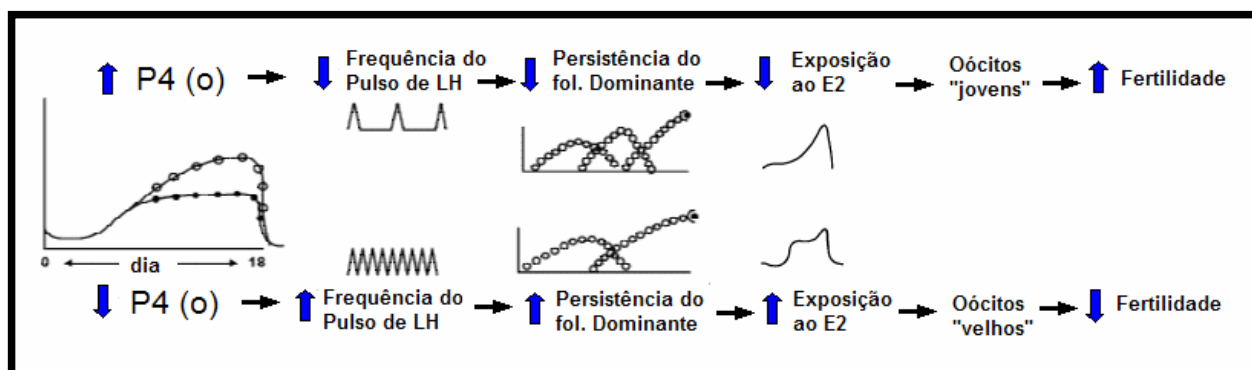


Figura 3: Efeito do padrão de desenvolvimento folicular sobre a fertilidade em vacas. Fonte: Iskeep (2004).

Adicionalmente, a mortalidade embrionária precoce pode ainda ser atribuída à baixa secreção de progesterona produzida pelo corpo lúteo no início da fase luteal. Vasconcelos *et al.* (2001) verificaram que a ovulação de pequenos folículos ($11,5 \pm 0,2$ mm) em vacas lactantes resultaram em corpos lúteos menores, em baixas concentrações de progesterona e menores taxas de concepção, quando comparados com as ovulações de folículos maiores ($14,5 \pm 0,2$ mm). Pesquisas têm observado que a elevação pós-ovulatória nos níveis plasmáticos de progesterona (BILODEAU-GOESEELS & KASTELIC, 2003) é essencial para a manutenção da gestação. Em vacas com baixa fertilidade, tem se verificado que estas apresentam um lento aumento na taxa de progesterona durante o período pós-ovulatório (CHAGAS e SILVA *et al.* 2002). Neste caso, a mortalidade embrionária pode estar associada a uma menor produção de Interferon-*tau* (IFN-*t*) pelo concepto (BILODEAU-GOESEELS & KASTELIC, 2003), visto que há uma correlação positiva entre as concentrações de progesterona materna com a produção de IFN-*t*, resultando no fracasso do reconhecimento materno da gestação (KERBLER *et al.*, 1997).

Além disso, também há evidências de que as baixas concentrações de progesterona podem influenciar a morfologia do endométrio no ciclo subsequente (SHAHAM-ABALANCY *et al.*, 2001), e ainda, exercer um importante papel na regulação de secreções uterinas essenciais para o desenvolvimento embrionário inicial, tais como proteínas e fatores de crescimento (SREENAN *et al.*, 2001), e na expressão de mRNA uterino para os receptores de progesterona e estradiol (MCNEILL *et al.*, 2006). Dessa forma, uma redução nas concentrações plasmáticas de progesterona pode ainda retardar a taxa de crescimento e desenvolvimento embrionário, afetando sua sobrevivência (SREENAN *et al.*, 2001).

Em novilhas de corte, Diskin *et al.* (2004) demonstraram que há uma associação entre as concentrações periféricas de progesterona 7 dias após a inseminação artificial e a sobrevivência

embrionária (Fig. 4). Além disso, estudos têm revelado evidências em ovinos (PARR *et al.*, 1987), suínos (ASHWORTH, 1991) e vacas leiteiras (STARBUCK *et al.*, 2001) que uma suplementação com progesterona em animais que apresentam baixas taxas de sobrevivência embrionária, como resultado de uma insuficiência deste hormônio, reduz o risco de perdas embrionárias.

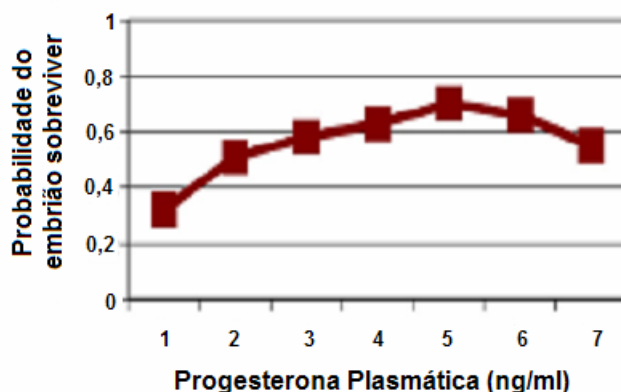


Figura 4: Relação entre as concentrações de progesterona plasmática no dia 7 após a inseminação artificial e subsequente taxa de sobrevivência embrionária em novilhas. Fonte: Diskin *et al.* (2004).

Em relação às anormalidades cromossômicas, recentes estudos usando a hibridização fluorescente *in situ*, com sondas específicas para a análise de cromossomos *in vivo* de embriões bovinos, revelaram que a mixoploidia, ou seja, a presença de uma mistura de células diplóides e poliplóides, aumentou de 5% no 2º dia para até 31% no 5º dia após a fecundação (VIUFF *et al.*, 2001). Contudo, apenas 25% dos embriões nos dias 7–8 foram mixoplóides apresentando menos de 10% de células poliplóides (VIUFF *et al.*, 1999). Segundo Hare *et al.* (1980), a manutenção da gestação é compatível com a presença de até 25% das células poliplóides no trofoblasto embrionário do dia 12–18. Esse fato mostra que a mixoploidia representa uma porcentagem mínima de perdas embrionária em vacas. Os verdadeiros embriões poliplóides seriam eliminados antes de eles clivarem a fase de oito células (HYTTEL *et al.*, 2001).

Por outro lado, a frequência de anormalidade cromossômica em embriões produzidos *in vitro* é significativamente maior que aqueles produzidos *in vivo* (KING *et al.*, 1995; VIUFF *et al.*, 1999; 2000). No caso da transferência nuclear, a situação é provavelmente até mais pronunciada, visto que apenas 1–2% dos embriões reconstruídos resultam em crias vivas, sugerindo que as anormalidades embrionárias podem ser o fator mais importante para a mortalidade embrionária nestas situações (YIN *et al.*, 2002).

As anormalidades que afetam um ou dois cromossomos podem estar presentes no genoma materno ou no seu antepassado e podem transmitir a uma proporção dos gametas. Estas anormalidades

podem também surgir como erros no processo na formação de gametas, na fecundação ou durante o desenvolvimento. A anormalidade cromossomal mais característica em bovino é a translocação de Robertsonian (POPESCU & PECH 1991), caracterizada por uma fusão entre dois cromossomos não-homólogos (1 e 29), resultando em um único cromossomo. Os portadores dessa alteração produzem seis diferentes tipos de gametas, somente dois destes podem produzir descendências viáveis, enquanto que os outros produzem embriões cromossomicamente desequilibrados. A morte destes embriões pode ocorrer dentro da 1ª ou 2ª semana de desenvolvimento. Outras translocações resultam nas baixas taxas de divisão de blastocistos *in vitro* e de concepção após a inseminação artificial e nas altas taxas de aborto (RUBES *et al.*, 1999; BASRUR *et al.*, 2001).

2.2.2 Efeito da nutrição sobre a sobrevivência embrionária

Em ruminantes, os embriões são dependentes de substâncias nutritivas, presentes no útero, decorrentes da adequada nutrição materna, para o seu desenvolvimento e sobrevivência (ASHWORTH, 1995). Contudo, a disponibilidade de alguns substratos energéticos, especialmente a glicose, tem sido caracterizada por sua capacidade em alterar o desenvolvimento embrionário (LIM *et al.*, 1999). Por exemplo, altas concentrações de glicose no ambiente de desenvolvimento embrionário podem depletar a expressão de transportadores de glicose, levando à ativação de vias apoptóticas, degradação da cromatina e fragmentação nuclear (HINCK *et al.*, 2003), resultando na redução do número de células do blastocisto e da viabilidade embrionária (LEA *et al.*, 1996).

Nesse contexto, o nível nutricional materno é considerado o principal fator nutricional que influencia o estabelecimento da gestação. Estudos têm destacado uma relação inversa entre o plano nutricional pós-monta e a concentração de progesterona periférica, estando associados com uma elevada taxa de perda embrionária. Em ovelhas, o incremento no nível nutricional durante o período pré-ovulatório leva a um aumento no tamanho do folículo ovulatório e na habilidade do corpo lúteo resultante em secretar progesterona. Entretanto, após a ovulação os elevados planos alimentares podem ocasionar uma supressão das concentrações plasmáticas de progesterona para níveis que comprometem a sobrevivência embrionária (ABECIA *et al.*, 1997). Em adição, Ashworth (1995) observou que ovelhas superalimentadas durante o início da gestação apresentaram uma redução na proporção de embriões produzidos. Acredita-se que estes fatos sejam resultantes do aumento do metabolismo da progesterona, em consequência de uma elevação na atividade de oxidação hepática devido ao maior fluxo sanguíneo porta-hepático em animais bem alimentados, resultando em uma redução das concentrações de progesterona periféricas (ABECIA *et al.*, 2006; ASHWORTH, 1995).

Por outro lado, a subnutrição também promove variações nas concentrações de progesterona. Nesse caso, foi verificado que ovelhas desnutridas apresentam mudanças na distribuição desse

hormônio no endométrio (ABECIA *et al.*, 2006; LOZANO *et al.*,1998). Em um estudo com ovelhas alimentadas com 0,5 e 1,5 M, foi observado que as concentrações de progesterona no endométrio foram reduzidos no dia 5 do ciclo dos animais alimentados com metade das exigências de manutenção (LOZANO *et al.*,1998).

Essas observações indicam que as mudanças no consumo de nutrientes podem influenciar o metabolismo da progesterona, bem como na manutenção das concentrações adequadas da mesma, impedindo que os mecanismos luteolíticos sejam superados ou suprimidos, diminuindo, conseqüentemente, a sobrevivência embrionária (ROBINSON *et al.*, 2002). Além disso, mudanças nas concentrações de progesterona circulante modificam a magnitude e a composição de polipeptídeos secretados pelo endométrio. Algumas dessas proteínas, como a proteína de ligação do retinol, são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento do concepto, além de possuírem uma importante função no transporte de nutrientes insolúveis na água através da placenta (ASHWORTH, 1995 ; HARNEY *et al.*,1993).

Em adição, pesquisas que estudam o efeito da nutrição sobre a reprodução sugerem que a dieta alimentar materna pode ainda ter um efeito significativo na qualidade do oócito, na competência de seu desenvolvimento e por fim na sobrevivência embrionária. Yaakub *et al.* (1997) observaram que vacas submetidas a um baixo consumo dietético apresentam oócitos com a morfologia alterada, tanto aqueles naturalmente ovulados, quanto os superovulados. Em contraste, Boland *et al.* (2001) não observaram diferenças na morfologia de oócitos colhidos de ovelhas submetidas a um plano alimentar de 0,5 M e 2 M.

Em relação ao desenvolvimento oocitário, McEvoy *et al.* (1995) observaram que altos níveis de alimentação antes da ovulação em ovelhas superovuladas reduziram a proporção de óvulos que se desenvolvem até blastocisto expandindo após 7 dias de cultivo quando comparadas com o grupo de animais que recebeu 0,6 vezes de suas exigências de energia diárias para manutenção. Porém, Lozano *et al.* (2003) informaram um menor número de oócitos de boa qualidade e embriões por animal em ovelhas superovuladas e alimentadas *ad libitum* quando comparadas com ovelhas do grupo controle (1,5 M) ou com aquelas submetidas a dietas de baixa energia (0,5 M), concluindo que dietas *ad libitum* são altamente prejudiciais para programas de superovulação.

Quanto a espécie bovina, nenhuma diferença significativa foi detectado na taxa de formação *in vitro* de blastocisto de vacas estimuladas com FSH e submetidas a diferentes dietas antes do abate, embora mais blastocistos tivessem sido produzidos a partir de oócitos de animais submetidos à baixa dieta (YAAKUB *et al.*, 1999). Por outro lado, o consumo energético restrito antes do abate aumentou o subsequente desenvolvimento *in vitro* de oócitos oriundos de pequenos folículos (MCEVOY *et al.*, 1997b). Posteriormente, Nolan *et al.* (1998) observaram que a produção de blastocistos após a

fecundação *in vitro* foi significativamente maior para oócitos recuperados, através da punção folicular transvaginal, em novilhas que receberam um baixo nível dietético. Nesse sentido, pôde-se sugerir que o efeito da nutrição sobre a reprodução pode acontecer a nível do oócito antes da ovulação.

Em novilhas, Dunne *et al.* (1999) mostraram que reduções súbitas no consumo de matéria seca próximo a inseminação afeta adversamente a sobrevivência do embrião (Tab. 1). Nesse estudo, foi observado que o consumo de energia reduzido de um alto nível alimentar 2M para 0,8 vezes a manutenção durante 2 semanas, imediatamente após a inseminação artificial, a taxa de sobrevivência embrionária foi menor que 40%. Por outro lado, quando as novilhas foram submetidas a um nível constante de consumo alimentar ou quando saíram de um baixo para um alto consumo alimentar a sobrevivência embrionária foi mais alta (65–71%). Vale ressaltar que não houve nenhuma associação entre o consumo de energia e a concentração de progesterona sistêmica. Embora, os mecanismos pelos quais a nutrição pode afetar o desenvolvimento do embrião não sejam conhecidos, foi mostrado que o consumo dietético também pode modificar a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento embrionário precoce (WRENZYCKI *et al.*, 2000).

Tabela 1: Efeito do tratamento nutricional antes e após a inseminação artificial sobre a taxa de sobrevivência embrionária em novilhas. Fonte: Dunne *et al.* (1999).

	Nível nutricional				Efeitos		Interação Pré-AI x Pós-AI
	B-B	B-A	A-A	A-B	Pré-AI	Pós-AI	
Animais (<i>n</i>)	66	65	60	56			
NºPrenhes	46	46	39	21			
%Prenhez	70	71	65	38	P<0,01	P<0,05	P<0,05

B: dieta 0,8 x M; A: Dieta 2,0xM.

Em adição, o nível nutricional pode, ainda, prejudicar o processo de reconhecimento materno da gestação, alterando, por exemplo, a produção de INF-*t* pelo concepto e a secreção de PGF_{2α} endometrial, levando ao fracasso o estabelecimento e a manutenção da gestação. Embora baseado em resultados de um pequeno número de animais, Abecia *et al.* (1999) observaram a evidência do efeito da nutrição materna sobre a secreção de IFN-*t* do concepto e na produção de PGF-2α pelo útero. Embriões colhidos no 15º dia de gestação de ovelhas submetidas a um nível alimentar de 0,5 M mostraram secretar baixas quantidades de IFN-*t in vitro* e o tecido endometrial colhido das mesmas apresentaram altos níveis de PGF_{2α} quando comparados com ovelhas alimentadas com 1,5 M. Este resultado foi acompanhado por uma redução na taxa de sobrevivência embrionária. Além disso, os resultados de Lozano *et al.* (2003) indicaram que uma baixa dieta de energia, durante o desenvolvimento inicial do

embrião colhidos de ovelhas superovuladas, aumentou a produção uterina *in vitro* de PGF_{2α}, ocasionando em um ambiente uterino adverso, comprometendo assim o desenvolvimento do embrião. Porém, neste estudo não foi observada nenhuma diferença entre os grupos alimentados quanto à secreção de IFN-*t* pelo concepto.

Além dos níveis nutricionais, outros fatores como o tipo da dieta oferecida pode influenciar os efeitos da nutrição sobre o sistema reprodutivo e subsequente fertilidade. Estudos têm relatado que íons de amônia, provenientes de dietas ricas em proteína, podem ter efeitos prejudiciais ao ambiente uterino, reduzindo a sobrevivência do espermatozoide, oócito ou embrião, devido à diminuição do pH uterino resultante das altas concentrações de uréia (ELROD e BUTLER, 1993; ELROD *et al.*, 1993). Nesse sentido, Fahey *et al.* (1998) conduziram um experimento com a finalidade de avaliar os efeitos dos altos níveis de uréia dietética sobre a qualidade e a sobrevivência do embrião em ovelhas. Nesse estudo, o número de embriões de oito-células recuperados no dia 4 oriundos de fêmeas tratadas com uréia foi menor quando comparado ao grupo controle. Com a mesma finalidade, Berardinelli *et al.* (2001), alimentando ovelhas com um excesso de proteína degradável (duas vezes as exigências) durante um ciclo estral perdurando até o ciclo seguinte, observou que o transporte do embrião foi impedido no dia 5 e depois disso, o transporte e o desenvolvimento do embrião no oviduto encontravam-se acelerados. Pelo contrário, McEvoy *et al.* (1997), depois de colher embriões de ovelhas suplementadas ou não com um excesso de uréia na dieta durante 12 semanas, observou uma demora no desenvolvimento dos embriões colhidos das ovelhas suplementadas. Esses autores têm concluído que o excesso de nitrogênio degradante no rúmen em dietas de ovelha eleva a uréia plasmática e amônia no útero, estando associado ao aumento da mortalidade embrionária.

Porém, o tratamento de ovelhas receptoras com uréia não apresentou efeito sobre a sobrevivência de embriões transferidos (FAHEY *et al.*, 1998). Em um estudo semelhante, embriões de boa qualidade produzidos *in vitro* foram transferidos a novilhas receptoras submetidas a diferentes concentrações de uréia no soro sanguíneo. Nesse estudo, também, não foram observadas perdas embrionárias, onde foi possível sugerir que a alteração no ambiente uterino não é o principal fator que contribui para a mortalidade embrionária quando dietas com alto teor de uréia é oferecida (GATH *et al.*, 1999).

Quanto aos efeitos das altas concentrações de uréia sobre a qualidade do oócito e o seu potencial de desenvolvimento, ainda há poucas informações disponíveis. Em um estudo, nenhuma mudança na taxa de desenvolvimento *in vitro* foi observada depois de tratar novilhas com altos níveis de uréia durante 9 dias (O'CALLAGHAN *et al.*, 1997) e a exposição de oócitos bovinos a amônia durante a maturação *in vitro* não afetou o posterior desenvolvimento embrionário (HAMMON *et al.*, 2000).

Em relação à taxa de concepção, os efeitos do alto consumo de proteína crua são equívocas. Dietas com altos níveis protéicos resultam no aumento das concentrações de uréia no plasma sanguíneo e no leite, estando associado com a baixa fertilidade em vacas de leite (BUTLER *et al.*, 1996). A uréia nitrogenada plasmática em excesso (19 mg/dl) tem sido associado a uma redução de 20% na taxa de concepção em vacas de leite (BUTLER, 1998). Porém, o excesso de proteína crua consumida não afetou o crescimento ou número de folículos ovarianos, bem como o número de embriões recuperados no dia 6,5 de vacas de leite não lactantes que receberam níveis energéticos adequados (ELROD e BUTLER, 1993). Da mesma forma, em novilhas de corte durante o balanço energético positivo, não foi observado qualquer efeito do alto consumo de proteína crua sobre a taxa de concepção, independente da origem da proteína, derivada do pasto ou da adição de uréia na dieta (DISKIN *et al.*, 2006; KENNY *et al.*, 2001; KENNY *et al.*, 2002). Semelhantemente, em ovelhas, Abecia *et al.* (1997) não observaram o efeito do nível de proteína dietética sobre a taxa de gestação 8 dias após a monta. Diante do exposto, é importante conduzir estudos com a finalidade de esclarecer se os efeitos adversos da uréia sobre a sobrevivência do embrião são dependentes do “*status*” energético do animal.

Em adição, os ácidos graxos dietéticos também afetam a fertilidade das fêmeas ruminantes. Contudo, tem-se verificado que o tipo de ácido graxo e não a energia adicional provida do mesmo pode estimular o desenvolvimento de grandes folículos. Em um estudo, a taxa de concepção foi significativamente mais baixa em vacas alimentadas com uma dieta com suplemento de gordura (50%) quando comparadas ao grupo tratado com formaldeído (87,5%), uma fonte rica de ácido linolênico (Petit *et al.*, 2001). Isso se deve a característica do ácido linolênico em induzir a formação do ácido eicosapentaenóico, um inibidor de síntese de prostaglandinas das duas séries. Em defesa a essa hipótese, dietas contendo altas concentrações de ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico, outro inibidor de síntese de prostaglandina das duas séries, diminuíram a secreção de PGF_{2α} uterino induzida em resposta a injeções de estradiol e oxitocina no dia 15 do ciclo estral (Mattos *et al.*, 2002).

Além disso, Hostetler *et al.* (2003) tem relatado que as concentrações inadequadas de alguns minerais nos tecidos, tais como cobre, iodo, ferro, manganês, selênio e zinco podem contribuir com a alta incidência na mortalidade embrionária precoce em bovinos. Adicionalmente, uma variedade de espécies de plantas venenosas presentes no pasto tem efeitos deletérios sobre a reprodução, prejudicando desde a gametogênese até a redução da função placentária, anormalidades anatômicas e perdas neonatal (JAMES *et al.*, 1992). O período em que o embrião ou feto é vulnerável a uma toxina específica pode ser tão breve quanto 1 a 2 dias (MCEVOY *et al.*, 2001).

2.3 Influência do crescimento placentário e do estado nutricional materno sobre o crescimento fetal.

A placenta é um órgão transitório responsável em suprir as necessidades do embrião e, posteriormente, do feto. Através desse órgão que ocorrem as trocas transplacentárias, de gases respiratórios e nutrientes, entre o sistema materno e fetal, realizadas através do fluxo sanguíneo umbilical e uterino. Durante a gestação, os nutrientes são divididos para vários tecidos maternos em ordem de prioridade de acordo com a taxa metabólica (REDMER *et al.*, 2004). Assim, os tecidos com alta atividade metabólica recebem maiores taxas de fluxo sanguíneo, ou seja, recebem quantitativamente mais nutrientes que os tecidos metabolicamente menos ativos. No animal adulto gestante, o útero grávidico (placenta/feto) recebe um maior fluxo de nutrientes devido ao seu estado de prioridade metabólico, contudo, em animais púberes prenhez, existe uma maior prioridade para a deposição de gordura (REDMER *et al.*, 2004).

Experimentos invasivos e severos, tais como a carunclectomia, a hipertermia e a embolia uteroplacentária, têm mostrado que o tamanho da placenta e a sua capacidade em transferir nutrientes são os maiores determinantes da trajetória do crescimento fetal (ANTHONY *et al.*, 2003). Segundo Redmer *et al.* (2004), o crescimento exponencial do feto, em ovelhas, é limitado ao último terço final de gestação (Fig. 3), iniciando aproximadamente no 90º dia e terminando por volta do 145º dia (a termo). Assim, aproximadamente, 90% do crescimento fetal ocorre durante o último terço da gestação. Contudo, o crescimento da placenta, em grande parte, ocorre durante os primeiros dois-terços de gestação, alcançando seu peso máximo no dia 90 (Fig. 5). Dessa forma, no momento em que a placenta alcança seu tamanho máximo, o feto apresenta apenas 10% do seu peso ao nascimento. Conseqüentemente, o crescimento inadequado da placenta pode comprometer o crescimento fetal através de uma vascularização pouco desenvolvida. Esse padrão de crescimento fetal e placentária tem sido reportado em vacas e em ovelhas (REYNOLDS & REDMER, 1995).

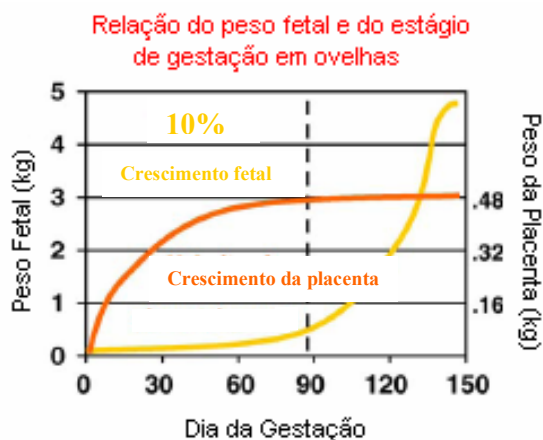


Figura 5: Trajetória do crescimento fetal e placentário em ovelha prenhe. Fonte: Redmer *et al.* (2004).

A dieta materna, além de influenciar o desenvolvimento embrionário, tem um grande impacto sobre o crescimento fetal, podendo, este, ser comprometido pela inadequada disponibilidade de nutrientes na circulação materna, limitando diretamente o suprimento de nutrientes do feto, interferindo, dessa maneira, na suscetibilidade fetal, no peso ao nascimento e no subsequente crescimento e produtividade individual (REDMER *et al.*, 2004). Além disso, em ovelhas, estudos verificaram que as variações na nutrição materna, durante o período de pré-concepção, podem, também, influenciar o amadurecimento e a função dos órgãos fetais, comprometendo a capacidade de transferência de nutrientes (OLAUSSON & SOHLSTROM, 2003, CONSTANCIA *et al.*, 2002), e ainda, o momento do nascimento (BLOOMFIELD *et al.*, 2003; EDWARDS & MCMILLEN, 2002).

A severa subnutrição materna, durante o início da gestação, reduz o crescimento fetal em diversos graus em ovelhas (PARR *et al.*, 1986; MELLOR, 1983). Contudo, em vários estudos nessa espécie, uma restrição de nutrientes maternal, de moderada a severa, imposta entre a gestação inicial-média e a gestação média-final, não afetou o peso ao nascimento dos cordeiros. Porém, apesar de nenhum efeito sobre esse parâmetro, a restrição de nutrientes, durante a primeira metade da gestação, comprometeu a função cardiovascular e a deposição de gordura na cria resultante (SYMMONDS *et al.*, 2003; GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2004). Ao contrário, um recente estudo no qual ovelhas tiveram uma restrição alimentar de 50% dos requerimentos energéticos, do 28º dia ao 80º dia da gestação, os pesos fetais no 80º dia foram reduzidos a 32% (VONNAHME *et al.*, 2003). Redmer *et al.* (2004), avaliando a vascularização placentária, verificaram que a redução do consumo de nutrientes maternal para 60% das exigências iniciadas no 50º dia de gestação resultou em pesos fetais semelhantes ao iniciado no 90º dia.

Assim, os efeitos da restrição nutricional durante a gestação em ovelhas adultas são incompatíveis, podendo estar ligadas a diversos fatores, tais como, a duração da restrição alimentar, o estágio de prenhez avaliado, a interação entre o peso vivo materno na hora da fecundação e o *status* de gordura ou das reservas nutricionais das mesmas antes de serem submetidas ao tratamento alimentar (RUSSEL *et al.*, 1981).

No que se refere à superalimentação, ainda há poucos estudos sobre o seu efeito no crescimento fetal em ovelhas adultas. Contudo, estudos demonstraram que em ovelhas, púberes e prenhes, superalimentadas, a idade e o crescimento materno são de grande importância na determinação do sucesso da gestação. Em ovelhas púberes em crescimento, Wallace *et al.* (2001) verificaram que os pesos ao nascimento das crias resultantes foram reduzidos 150–200 g quando comparados com ovelhas

púberes já crescidas. Esta significativa redução na taxa de crescimento fetal foi atribuída a uma competição por nutrientes entre o corpo materno e o seu útero gravídico. Estudos têm demonstrado repetidamente que a hierarquia na divisão de nutrientes pode ser alterada dramaticamente em fêmeas jovens em crescimento ao detrimento do desenvolvimento do feto (WALLACE *et al.*, 1996; WALLACE *et al.*, 2001; WALLACE *et al.*, 1999a).

Por outro lado, o nível do consumo alimentar materno, também, parece ter um papel modificador na gestação. Quando ovelhas púberes são superalimentadas, estas apresentam um rápido crescimento, particularmente de tecido adiposo, às custas das exigências de nutrientes para o útero gestante, resultando em uma redução no crescimento placentário de 30–40% e no nascimento prematuro de cordeiros com, aproximadamente, 104 dias de gestação e com uma redução de peso ao nascimento de 25-30%, quando comparadas com ovelhas púberes moderadamente nutridas e com idade ginecológica equivalente (WALLACE *et al.*, 1999b).

Adicionalmente, recentes estudos verificaram que os pesos da placenta e da cria resultante são positivamente correlacionados, contudo a placenta é mais afetada no grupo de ovelhas púberes superalimentadas, conduzindo a uma diferença significativa na relação peso fetal: placentário. Uma relação semelhante foi observada entre o peso total do placentoma e o fluxo sanguíneo uterino e umbilical no 130º dia de gestação (WALLACE *et al.*, 2002). Além disso, estudos observaram que o oxigênio do sangue arterial fetal, bem como as concentrações de glicose fetal, insulina e IGF-I foram menores nos fetos com crescimento restrito em ovelhas superalimentadas quando comparadas com fetos com crescimento normal em ovelhas com alimentação moderada (WALLACE *et al.*, 2002; 2000; Tabela 2). Assim, o crescimento inadequado da placenta, a redução dos fluxos sanguíneos uteroplacental e da capacidade de transferência de nutriente são, claramente, os pontos centrais do efeito adverso na gestação em animais púberes superalimentados.

Tabela 2: Nutrientes fetais do sangue arterial e concentração de hormônios metabólicos (~130dia de gestação) em fetos com crescimento reduzido e normal de ovelhas submetidas a um alto e moderado consumo alimentar, respectivamente. Fonte: Wallace *et al.* (2002; 2000).

Consumo alimentar materno	Moderada	Alto	
Status do crescimento fetal	Normal	Restrito	Significância
Sangue arterial fetal			
Oxigênio (Mm)	3,0 ± 0,3	2,1 ± 0,2	P<0,05
Glicose (mM)	1,32 ± 0,05	0,9 ± 0,1	P< 0,002
Insulina (µU/mL)	16,7 ± 2,0	10,4 ± 1,48	P< 0,05
IGF-I (pmol/mL)	16,4 ± 0,98	8,6 ± 2,09	P< 0,01

3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a tendência do crescimento da exploração intensiva de caprinos, torna-se imprescindível o conhecimento dos efeitos da nutrição sobre o desempenho reprodutivo, no que se refere à fertilidade e ao processo de foliculogênese terminal, a fim de aumentar a produção desses animais e viabilizar a utilização de biotécnicas reprodutivas. Contudo, existe uma escassez na literatura sobre os efeitos da nutrição em vários parâmetros reprodutivos em caprinos.

O baixo conhecimento técnico sobre o adequado manejo reprodutivo e nutricional dos animais jovens é apontado como um dos maiores entraves na exploração de caprinos. Aproximadamente 20 a 40% de cabras nulíparas falham em estabelecer sua primeira gestação, caracterizando uma redução dos índices de fertilidade, o qual representa uma das principais causas que contribuem para a diminuição da produtividade do rebanho. Dessa forma, estratégias de manejo nutricional devem ser implementadas com a finalidade de aumentar os índices reprodutivos nesses animais.

Na espécie caprina, assim como em outros ruminantes, o potencial reprodutivo é influenciado pelos efeitos nutricionais a curto e a longo prazo, no estro e durante os diferentes estados fisiológicos, quando a fertilidade dos animais pode ser grandemente influenciada. Além disso, a disponibilidade de energia no tecido ovariano tem sido correlacionada com a melhoria dos índices reprodutivos e produtivos, sendo fundamental no controle da eficiência de tecnologias voltadas para a reprodução. Vários estudos têm descrito que o tratamento de animais com modificadores metabólicos, como a somatotropina, insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) exerce uma ação positiva sobre a regulação da função ovariana. Em bovinos, estudos *in vitro* revelaram que a insulina e o IGF são importantes mediadores do desenvolvimento folicular, esteroidogênese, maturação oocitária e subsequente desenvolvimento embrionário. Além disso, em cabras adultas, a administração de insulina exógena, antes do tratamento de sincronização e de superovulação, atuou positivamente sobre a resposta ovariana, aumentando o número de folículos recrutados e a taxa de ovulação. Contudo, apesar dos bons resultados observados em fêmeas adultas, a manipulação da insulinemia deve ser estabelecida cuidadosamente em fêmeas nulíparas e em crescimento, evitando o aumento excessivo da prolificidade e o conseqüente desgaste metabólico e ovariano desses animais.

Assim, torna-se necessária a elaboração de um protocolo de estimulação energética, de baixo custo e eficiente, que vise melhorar a fertilidade de cabras nulíparas sem comprometer o futuro desempenho reprodutivo desses animais e, conseqüentemente, maximizar a produção do rebanho nos sistemas de criação de caprinos no Nordeste do Brasil.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Em cabras nulíparas, a administração de insulina exógena em doses crescentes e repetidas, durante o tratamento de sincronização do estro, pode exercer um efeito positivo sobre a resposta ovariana e no desempenho reprodutivo pós-cobertura.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da administração de doses crescentes de insulina sobre os parâmetros reprodutivos de cabras nulíparas da raça Anglo-Nubiana.

5.2 Objetivos Específicos

- Comparar os perfis plasmáticos de insulina, durante o período de estimulação energética, e de progesterona do 3° até o 12° dia pós-monta;
- Monitorar o crescimento do folículo pré-ovulatório (FPO) e a taxa de ovulação;
- Comparar a taxa de sobrevivência embrionária do 3° dia pós-monta até o parto;
- Verificar o efeito da insulina sobre a prolificidade.

6 CAPÍTULO 1

ESTRO E TAXA DE OVULAÇÃO APÓS A SINCRONIZAÇÃO DE CABRAS ANGLO-NUBIANA NULÍPARAS TRATADAS COM DOSES CRESCENTES DE INSULINA

*(Estrous and ovulation rate after synchronization of nulliparous Anglo-nubian goats treated
with increasing insulin doses)*

Periódico: Animal Reproduction
(6: 225, 2009)

RESUMO

A baixa resposta reprodutiva de fêmeas nulíparas é o principal fator limitante da produtividade do rebanho de caprinos. Vários estudos com cabras adultas têm demonstrado que a administração de insulina exerce uma ação positiva sobre a função ovariana, aumentando o número de folículos recrutados e a taxa de ovulação. Contudo, nenhum desses estudos revela evidências sobre a resposta reprodutiva à administração de insulina em cabras nulíparas e em crescimento. Assim, o objetivo desse trabalho foi comparar a resposta à sincronização de estro e a taxa de ovulação em cabras nulíparas da raça Anglo-nubiana tratadas com doses crescentes de insulina. O experimento foi realizado na cidade de Tauá-CE (6,0°S e 40,4°O). Quinze cabras nulíparas da raça Anglo-nubiana, com peso vivo médio de $26,60 \pm 4,70$ kg (média \pm E.P) e idades entre 8 e 15 meses, tiveram seus estros sincronizados com a utilização de esponjas intravaginais impregnadas com 60mg de MAP por 10 dias, sendo que no 8º dia foi administrado 50 μ g de cloprostenol. As cabras foram alocadas em três grupos: Insulina I (n=5), Insulina II (n=5) e Controle (n=5). No grupo Insulina I e II, todos os animais foram tratados subcutaneamente com insulina humana de longa duração com doses, respectivamente, 0,14 UI/kg PV/dia e 0,2 UI/kg PV/dia, durante três dias consecutivos, iniciando 48h antes da remoção das esponjas. O estro foi monitorado três vezes ao dia e as fêmeas com estro evidente foram montadas no início do estro e após 24h o seu registro, utilizando três machos da mesma raça e de fertilidade confirmada. A taxa de ovulação foi verificada três dias após a monta, através da utilização de um equipamento de ultra-som, Falco 100, acoplado a um transdutor linear de 6/8MHz. O efeito da insulina foi analisado através do programa SAS GLM. E a comparação entre os grupos foi realizada através do teste de Duncan. Os valores foram expressos como média \pm E.P. Todas as cabras exibiram estro em resposta ao tratamento de sincronização. A duração do estro, o intervalo para o início do estro e para a ovulação não diferiu entre os grupos ($P < 0,05$), apresentado, respectivamente, médias de $37,80 \pm 1,93$; $28,67 \pm 2,12$; $59,80 \pm 2,18$ horas. A taxa de ovulação foi significativamente ($P < 0,05$) maior no grupo Insulina I quando comparado com o grupo Controle ($2,6 \pm 0,51$ vs. $1,0 \pm 0,2$; $P < 0,01$), enquanto que o grupo Insulina II foi similar aos outros tratamentos ($1,6 \pm 0,4$). Em conclusão, o tratamento com doses crescentes de insulina em cabras nulíparas não afetou a resposta à sincronização do estro, contudo a administração da dose de 0,14 UI/kg PV/dia produziu uma maior taxa de ovulação.

Estrous and ovulation rate after synchronization of nulliparous Anglo-nubian goats treated with increasing insulin doses

E.S.P. Pinheiro¹; A.L. Souza¹, K.C. Almeida¹, A.C.L.Câmara¹, I.J.Arruda¹; I.M.T.Lima¹, V.J. F. Freitas¹, D.I.A Teixeira¹, D.Rondina¹

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará. 60740-000, Brasil.

Introduction

The lower reproductive response of nulliparous at first mating is a recognized limiting factor of goat husbandry. Several studies showed in adult goats that insulin administration can have a positive action on ovarian function, increasing numbers of recruited follicles and ovulation rate (1, 2). However, these studies did not appointed any evidence about the reproductive response to insulin administration in young animals. Thus, the aim of this work was to compare the response of estrous synchronization and ovulation rate in nulliparous Anglonubian goats treated with increasing insulin doses.

Materials and Methods

The experiment was conducted in Tauá-CE (6,0°S and 40,4°W). Fifteen Anglo-nubian nulliparous goats with live weight of 26.60 ± 4.70 kg (mean \pm SEM) and aged between 8 and 15 months has their estrous synchronized with 60 mg MPA vaginal sponge for 10 days and 50 μ g of cloprostenol on 8th day. Goats were allocated in three groups: Insulin I (n=5), Insulin II (n=5) and Control (n=5). In Insulin I and II groups, all animals were treated subcutaneously with 0.14 IU/kg BW/day and 0.2 IU/kg BW/day human long acting insulin, respectively, during three consecutive days beginning 48h before sponge removal. In control group saline solution was administrated. The goats were monitored three times a day (06:00, 12:00 and 18:00 hours) for the occurrence of estrous and mated at onset of estrous and again 24 h later, using three Anglonubian bucks of confirmed fertility. Ovulation rate was recorded 3 days after mating, using a Falco 100 ultrasound scanner (Pie Medical[®], Maastricht, Netherlands) fitted to 6/8 MHz linear-array probe. The insulin effect was analyzed by the SAS GLM procedure. Comparison between groups was performed by the Duncan test. Values were expressed as mean \pm SEM.

Results and Discussion

All goats showed estrus after synchronization treatment. Estrus length, the interval between sponge removal and estrus onset as well as ovulation did not differ between groups ($P < 0.05$), with a pooled mean, respectively of 37.80 ± 1.93 ; 28.67 ± 2.12 ; 59.80 ± 2.18 hours. These data are in agreement with (1). Higher induction of estrous has been reported in insulin-treated anestrus cattle (3) and goat (2), suggesting an insulin effect on steroidogenesis. Ovulation rate was significantly ($P < 0.05$) higher in the Insulin I than in the Control group (2.6 ± 0.51 vs. 1.0 ± 0.2 ; $P < 0.01$), while in Insulin II group was similar to other treatments (1.6 ± 0.4). Similar findings in goats treated with insulin prior superovulation have been reported (1). The positive effect of insulin on ovarian response in low dose insulin group should be due to either an increase of gonadotrophin-dependent follicles number (4) as well as reduction of follicular atresia (5). Based on our results, we can conclude that treatment with increasing insulin doses in nulliparous goats did not affect the response to estrous synchronization; however the administration of 0.14 IU/kg BW/day produced a higher ovulation rate.

References

- (1) Selvaraju S, Agarwal SK, Karche SD, Majumdar AC. 2003. *Theriogenology*, 59:1459-1468; (2) Sarath T, Mehrotra S, Agarwal SK, Varshney VP, Hoque M, Shankar U, Singh S.K. 2008. *Anim Reprod Sci*, 108:216-225; (3) Shukla SN, Agarwal SK, Shankar U, Varshney VP, Majumdar AC. 2005. *Indian J Anim Sci*, 75:1135-1139; (4) Gong JG, Webb R. 1996. *Anim. Breed. Abstr*, 64:195-204; (5) Matamoros IA, Cox NM, Moore AB. 1991. *J. Anim. Sci*, 69:2081-2091.

E-mail: beth_saraiva@yahoo.com.br

7 CAPÍTULO 2

ESTRO, RESPOSTA OVARIANA E FERTILIDADE EM CABRAS NULIPARAS CRIADAS SOB SISTEMA EXTENSIVO APÓS ADMINISTRAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE INSULINA NO TRATAMENTO PROGESTAGENO- CLOPROSTENOL

(Estrus, Ovarian and Fertility Responses in Nulliparous Free-ranging Goat after Administration of Increasing Insulin Doses at Progestagen-Cloprostenol Treatment)

RESUMO

Para comparar a resposta reprodutiva de cabras nulíparas submetidas a doses crescentes de insulina, 39 cabras da raça Anglo-nubiana tiveram seus estros sincronizados pelo uso de esponjas intravaginais contendo 60 mg de MAP (Progespon, Syntex, Argentina), por 10 dias associado a um tratamento luteolítico de 50 µg de cloprostenol (Ciosin, Coopers, Brasil), 48 h antes da remoção da esponja (RE). As cabras foram alocadas em três grupos: Insulina I ($n=13$), Insulina II ($n=13$) e Controle ($n=13$). No grupo Insulina I e II, todos os animais foram tratados subcutaneamente com insulina humana de longa duração com doses de 0,14 UI/kg PV/dia e 0,2 UI/kg PV/dia, respectivamente, durante três dias consecutivos, iniciando 48h antes da RE. Já os animais do grupo Controle receberam 0,5 mL de solução salina como placebo. O estro foi monitorado três vezes ao dia e as fêmeas com estro evidente foram montadas no início do estro e 24 h depois, utilizando três machos da mesma raça e de fertilidade comprovada. Com a ultra-sonografia transretal, através do uso do equipamento de ultra-som, Falco 100, acoplado a um transdutor de 6/8 MHz, foi monitorada a dinâmica do folículo ovulatório, iniciando 24 h após a RE até a ovulação e no 3º dia pós-monta foi determinada a taxa de ovulação, e ainda, foi realizado o diagnóstico de gestação aos 25, 35 e 45 dias. As imagens ultrasonográficas dos ovários foram analisadas através de um programa computacional específico. Durante o experimento, foram realizadas colheitas de sangue, iniciando 48 h antes da RE até o 12º dia de gestação, para a análise dos níveis de insulina e progesterona. A administração de insulina elevou os níveis plasmáticos da mesma ($P < 0,05$) nos animais tratados, contudo não foi encontrada nenhuma evidência significativa ($P > 0,05$) entre os grupos sobre a resposta ao estro. O crescimento do folículo pré-ovulatório indicou um efeito significativo do tratamento da insulina ($p < 0,05$). Além disso, as cabras submetidas à administração de insulina exibiram uma maior resposta ovariana ($p < 0,05$) quando comparada com as cabras não tratadas ($1,70 \pm 0,23$ vs. $1,00 \pm 0,21$). O grupo Insulina 0,14UI exibiu um maior diâmetro do CL ($p < 0,05$) e 50% das ovulações ocorreram as 36h do IE ($p < 0,05$). Nos grupos Insulinas foram observadas uma maior frequência de perdas embrionárias até o 12º dia de gestação, contudo estas reduziram significativamente ($p < 0,05$) com o decorrer da gestação, enquanto que no grupo controle as perdas se mantiveram similares entre os intervalos. Ao parto, a prolificidade foi similar entre os grupos Insulina 0.14 UI ($1,50 \pm 0,22$), Insulina 0.2 UI ($1,14 \pm 0,14$) e Controle ($1,20 \pm 0,20$) ($p > 0,05$). Os resultados indicam que a administração de insulina induz um efeito positivo sobre a resposta ovariana e fertilidade em cabras nulíparas. Além disso, nesses animais o desempenho reprodutivo parece não ser dependente do aumento da dose de insulina.

Estrus, Ovarian and Fertility Responses in Nulliparous Free-ranging Goat after Administration of Increasing Insulin Doses at Progestagen-Cloprostenol Treatment

Pinheiro E.S.P.¹, Rondina D.^{1a}, Galeati G.², Freitas V.J.F.¹, Souza A.L.¹, Teixeira D.I.A.¹, Almeida K.C.¹, Govoni N.², Lima I.M.T.¹

1* Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil;

2 Facoltà di Veterinaria, Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy

* Institute where the work was conducted.

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

Laboratório de Nutrição e Produção de Ruminantes - Universidade Estadual do Ceará – Faculdade de Veterinária.

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

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

E-mail: davide@pq.cnpq.br

Abstract

Thirty-nine nulliparous and cyclic free-ranged Anglo-nubian goats were synchronized using 60 mg MPA vaginal sponge for 10 days and 50 µg cloprostenol, 48 h before sponge removal (SR). Goats were allocated in three groups with 13 animals each. Groups Insulin 0.14 IU and Insulin 0.20 IU were treated subcutaneously, during three consecutive days, beginning 48h before SR, with 0.14 IU/kg BW/day and 0.2 IU/kg BW/day of long acting insulin respectively. The Untreated group received 0.5ml saline solution. The goats were monitored for the occurrence of estrous and mated at onset of estrous (OE) and 24 h later. Transrectal ultrasonography was performed for monitoring ovulatory follicle dynamics, ovulation rate and the pregnancy. Blood samples were collected from 48h before SR to the 12th day of gestation for insulin and progesterone assay. Insulin administration exhibited a positive increase ($p < 0.05$) in plasmatic insulineamia, while estrus response was similar among groups. Insulin treated goats showed a higher ($p < 0.05$) ovulatory rate than the untreated goats (1.70 ± 0.23 vs. 1.00 ± 0.21), and, during the gestational period, a significant decrease in pregnancy losses ($p < 0.05$). Meanwhile nulliparous females from Insulin 0.14 IU group presented a greater size of ovulatory follicles at 12 and 18 hours of estrus ($p < 0.05$), a higher concentration of ovulation ($p < 0.05$), a greater size of CL ($p < 0.05$) and a greater litter size at parturition ($p >$

0.05). It was concluded that administration of insulin induced a positive effect on ovarian and fertility response in nulliparous goats. Furthermore, in these animals the reproductive performance appears to be non dependent to increase of insulin dose.

Key words: Reproductive response. Insulin. Goats. Nulliparous

Introduction

The level of reproductive performance depends on the interaction of genetic and environmental factors, but this performance is particularly susceptible to the latter, for example, the seasonal availability of nutrients can affect reproduction considerably. Reproductive efficiency in female goats is determined by many different processes including cyclic activity, ovulation rate, fertilization rate and the post-partum anestrous period. In addition, the conception rate to first service is the combined consequence of fertilization, early embryonic, late embryonic and foetal development, and each of these steps for pregnancy establishment may be affected (Quirin et al., 1994).

In small ruminants exploration systems, one of the main objectives is to reduce the age of the first calving, preventing to compromise the posterior reproductive performance of these animals. However, there is a lack of information on nulliparous goats. In addition, there are some problems to establish practices in reproductive management in harsh environments such as the semi-arid regions of Northeastern Brazil. In these areas most of the farms raise animals extensively, by using native pasture.

Several studies have demonstrated that treatments with metabolic hormones and growth factors, such as somatotrophin, insulin and IGF-I, improve farm animals reproductive performance (Gong et al., 1997). In vitro, insulin and IGF-I are important for follicular development, steroidogenesis, oocyte maturation and further embryo development (Totey et al., 1996; Daliri et al., 1999). Recent studies have reported that the administration of exogen insulin may influence follicular development, favoring gonadotrophic-dependent follicle recruitment and increasing the ovulatory follicle diameter and the ovulation rate (Simpson et al., 1994; Ramoun et al., 2007; Gong et al., 2002; Sarath et al., 2007), besides stimulating a greater follicular estradiol production in ruminants (Butler et al., 2004; Shukla et al., 2005; Ramoun et al., 2007). Still, direct insulin administration has improved the response to superovulation treatments (Selvaraju et al., 2003) and the quality of in vivo (Sousa et al., 2008) and in vitro (Thompson, 2006) produced embryos.

Thus, the aim of this study was to compare the effect of different doses of insulin on reproductive response of nulliparous goats after an estrus synchronization treatment and reared under an extensive management system in Northeastern Brazil.

Materials and Methods

Animals and management

The experiment was conducted with thirty-nine nulliparous and cycling Anglonubian goats at the Chapadinha Farm located at 6.0°S, 40.4°W in Tauá, Northeastern of Brazil, from November 2007 to February 2008 during the dry season. The mean temperature and rainfall recorded during the experimental period was 28.7 ± 0.2 °C (mean \pm SD) and 78.6 mm respectively. Animals were kept under similar feeding and management conditions. Briefly, goats were reared free-range, according to the following management: they grazed on natural pastures during the day and were penned during the night due to the presence of predators. Herein animals received 200g/head of concentrate with 18% of crude protein.

Estrus synchronization and mating

Estrus was synchronized using 60 mg MPA (Progespon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) vaginal sponge for 10 days and i.m. of 50 μ g of cloprostenol (Ciosin, Schering-Plough Coopers, São Paulo, Brazil), 48 h prior to sponge removal. A buck was introduced three times daily in the pen to detect estrus (06:00, 12:00, 18:00 hours), 20 h after sponge removal for a 84 h period. Does in estrus were mated at estrus onset and 24 h later, using three Anglo-nubian fertile bucks (1:4 mating ratio).

Insulin administration

Before estrus synchronization, the does were divided into three groups with similar ($p > 0.05$) age (9.85 ± 0.43 months) and body weight (24.36 ± 0.68 kg) mean \pm SEM, according to the insulin dose: Insulin 0.14 (n = 13): 0.14 IU/kg body weight /day; Insulin 0.20 (n = 13): 0.2 IU/kg body weight /day and Untreated (n = 13). In Insulin groups, the does were subcutaneously treated with human long acting insulin (100 IU/ml; Novolin N, Novo Nordisk A/S., Bagsvaerd, Denmark) during three consecutive days beginning 48 h before sponge withdrawal. In Untreated group females received injection of 0.5ml saline solution.

Ultrasound analysis

In five animals from each group, transrectal ultrasonography of the ovaries was performed for monitoring ovarian follicular dynamics, using a 6–8MHz linear-array probe, fitted to a Falco 100 scanner (Pie-Medical®, Maastricht, Netherlands), as described by Teixeira et al. (2008). Growing pattern of the ovarian follicles was monitored at 6 h intervals from the onset of the estrus until ovulation. In all goats transrectal ultrasonography was used to determine the ovulation rate by counting of corpora lutea (CL) three days after mating, and at 25 and 45 days after breeding for pregnancy detection.

Images analysis

The ultrasonographic images were recorded and transferred to a computer hard disk for further detailed evaluation. The diameter of the preovulatory follicles and CL's per ovary was measured on recorded scanning images, using the computer software (Image J, National Institutes of Health, Millersville, EUA), after calibration. For the stored images obtained with a frequency of 6.0 MHz and 8.0 MHz, it was established that 5 mm represented 10.66 and 22.34 pixels, respectively. This calibration was made by counting the number of pixels between two bars that represent 10mm on the horizontal and vertical sonogram axis scale, respectively.

Progesterone and Insulin assay

From 48h before sponge removal to 24h after (daily) and from 3rd to 12th day after mating (every three days), before feeding and insulin administration, blood samples were collected in heparinized tubes by venipuncture. From plasma, progesterone and insulin were assessed by RIA kit (IBL International GmbH, Flughafenstr, Hamburg, Germany) (Rondina et al. 2005).

Statistical Analysis

All data were analyzed using SAS program software (SAS, Inc., Cary, NC, USA). The effect of insulin administration (Untreated, Insulin 0.14 UI or Insulin 0.20 UI), was analyzed by the percentage of does in estrus and by the evaluation of the ovulation rate and the litter size using NPAR1WAY procedures, and for the others parameters of estrus and ovarian responses by GLM procedures. Differences among ovulation number during interval from estrus onset until ovulation were analyzed by chi-square test. The effect of insulin treatment in progesterone production, insulin levels and preovulatory follicle size was analyzed by GLM procedures for repeated measures analysis of variance. Interval of assessment was the

repeated measure. In pregnancy loss insulin effect was tested by repeated measures analysis for categorical variables (CATMOD procedures). Days of pregnancy were the repeated measure. Values were expressed as means \pm SEM.

Results

Insulin administration showed a significant effect ($p < 0.05$) on insulineaemia changes (Fig. 1) measured from the end of estrus synchronization treatment to the third day after mating. In this period all groups exhibit a positive cumulative increase in insulin plasmatic concentration (Fig. 1). Table 1 shows estrus and ovarian responses to estrus synchronization. Even though no statistically significant evidence ($p > 0.05$) was found in insulin groups, it was observed that twice the number of animals did not show estrus behaviour when compared to untreated animals (4 vs. 2). In these treatments, it was also observed a marked reduction in interval between the sponge removal and estrus onset with a difference of more than seven hours between the opposite groups (Untreated vs. Insulin 0.20 UI), and an enhancement of estrus length in Insulin 0.14 UI group.

Ultrasonographic analysis of ovarian follicle growing pattern (Fig. 3) performed throughout the 24 hours after the estrus onset, indicated a significant effect of insulin treatment ($p < 0.05$). At 12 and 18 hours after estrus onset, Insulin 0.14 UI group showed a greater size, when compared to Insulin 0.20 UI ($p < 0.05$). Moreover significant effect ($p < 0.05$) of insulin administration was observed in ovulatory response and CL diameter (Table 1). In these parameters goats insulin treated exhibit a higher ($p < 0.05$) mean ovulation rate when compared to untreated goats (1.70 ± 0.23 pooled mean vs. 1.00 ± 0.21), and Insulin 0.14 UI group presented the highest CL size ($p < 0.05$).

Distribution of ovulation events (Fig. 2) revealed that 80% of them occurred in the thirty hours after estrus in Untreated and Insulin 0.20 UI groups while in Insulin 0.14 UI more than 50% of ovulation occurred at 36 hours from OE ($p < 0.05$). All animals that showed estrus ovulated. However in five animals ovulation was not accompanied by estrus and other five does did not exhibit estrus nor ovulation.

Figure 3 show progesterone pattern during the 12 days after mating in pregnant and non-pregnant animals. Insulin administration did not demonstrate significant difference in pregnant does. All Insulin treatments caused an increase in the progesterone levels, during the assay period, reaching a maximum mean level nine days after mating.

In animals that diagnosed as non pregnant by ultrasonography at 25 days of gestation, progesterona (Fig. 3) was used to demonstrate the period when pregnancy failed to occur.

Does that failed to become pregnant between 12-24 days after mating (Pregnancy loss > 12d group), showed progesterone level higher than 1ng/mL starting from Day 6, but significantly inferior concentration ($p < 0.05$) on Day 9, when compared to pregnant goats. In the other females that presented pregnancy loss between 3-12 days after mating, progesterone levels on Day 12 was lower than 1 ng/mL (Fig. 3).

In Insulin groups, it was observed the highest frequency of pregnancy loss (N° of losses / N° of ovulating does), before the 12th after mating (Fig. 3). However, during the gestational period, losses decrease significantly ($p < 0.05$) in these treatments, whereas in Untreated group pregnancy losses were similar throughout the intervals. In these goats on day 45 of pregnancy, losses were accumulated to 60%. On the same period, pregnancy rate (No of pregnant does / No of ovulating does) was $50.00 \pm 16.67\%$, $54.55 \pm 15.75\%$ and $58.33 \pm 14.86\%$ for Untreated, Insulin 0.14 UI and Insulin 0.20 UI groups respectively.

At kidding, litter size (litter size / dam that gave birth), was respectively 1.50 ± 0.22 for Insulin 0.14 UI, 1.14 ± 0.14 for Insulin 0.20UI and 1.20 ± 0.20 for Untreated group ($p > 0.05$).

Discussion

The results of the present study demonstrated that repeated doses of insulin in nulliparous does, before mating, induce an increase in the ovarian response and a reduction on the pregnancy losses throughout the gestational period, and still that the reproductive response in these animals is not proportionally dependent on the increase in the insulin dose.

Our data did not make evident a significant effect of the insulin treatment over the response to estrus, after synchronization, however, the results were superior, when compared to the results reported in does synchronized by the same treatment (Amarandis et al., 2000; Romano, 2004), and similar, when associated to gonadotrophin administration (Greyling and Van der Nest., 2000; Motlomelo et al., 2002; Fonseca et al., 2005; Maffili et al., 2006).

Insulin has a direct stimulatory effect over estradiol production thru its ability to increase the pulsatility of LH secretion and the aromatase activity (Bucholtz et al., 2000; Butler et al., 2004). A greater response to estrus has been reported in cows, buffaloes and goats in anestrus treated with exogen insulin (Shukla et al., 2005; Ramoun et al., 2007; Sarath et al., 2008). In bovines and caprines, insulin administration concomitant to superovulation treatment unchains an increase in the production of follicular estradiol and estrogen-active follicles (Simpson et al., 1994; Selvaraju et al., 2003).

Similar to the reports in does (Selvaraju et al., 2003) and in other species (Harrison e Rendel, 1986; Hinch e Roelofs, 1986), it was also observed an increase in the ovulation rate in the insulin treated animals. In caprines and in ovines, insulin acts in the reduction of follicular atresy and in the increase of gonadotrophic-dependent follicle number (Gong et al., 1994; Majumdar et al., 1997). Many researches have described that the ovulation rate may be manipulated by the alimentary plan, which acts directly in the ovary, stimulating the activity of modulators, such as IGF-I, through changes in the insulin-glucose system (Muñoz-Gutierrez et al., 2002; Letelier et al., 2008, Meza-Herrera et al., 2008).

While the ovulatory follicle growth and the ovulation distribution differed among the groups, insulin administration did not affect the maximum diameter of the pre-ovulatory follicle, contrasting with the findings from other studies, where exogen insulin increased significantly the diameter of the great follicles (Simpson et al., 1994; Ramoun et al., 2007; Sarath et al., 2008). In vitro, works with caprines and bovines have described that the oocitary quality and its competence to develop until blastocyst stage are related to follicular growth phase and to follicular diameter (Crozet et al., 1995; Machatkova et al., 2004; Sangha e Sharma, 2006). Based on these observations, insulin acts in an indirect way, increasing follicle sensitivity to FSH (Simpson et al., 1994).

The absence of effects on the preovulatory follicle (POF) diameter, observed in the present study, may be related to the unfavorable endocrine environment, at the insulin administration moment. It is known that high concentrations of exogen progesterone, from the vaginal device, reduce the pulsatility of LH secretion (Goodman and Karsh, 1980; Rubianes and Menchaca, 2003), compromising folliculogenesis terminal development. Ginther and Kot (1994) and Uribe-Velasquez et al., (2008), demonstrated that the pre-ovulatory follicles developed within a high progesterone concentration environment reach smaller diameters. Hence, insulin additional effect may have been masked by the exogen progesterone action. It is worth it to emphasize that POF's mean diameter, observed in this study, is in agreement with other studies with the same species (Gonzalez-Bulnes et al.,1999; Gonzalez-Bulnes et al.,2004; Simões et al.,2007; Fernandez-Moro et al., 2008).

In the present study, progesterone concentration in pregnant does treated with insulin was highest on day 9 after mating, indicating the presence of a well developed and functional corpus luteum (CL). Several authors reported the positive effect of insulin over the development of CL, due to the increase in growth and proliferation of the granulosa and teca cells (Stewart et al., 1995). However, while insulin influenced the CL diameter (Khan et al., 2005; Sarath et al., 2008), the progesterone concentration was not affected by the treatment

with insulin, which disagrees with the findings from other authors (Selvaraju et al., 2002; Sarath et al., 2008).

Our findings illustrated that although the increase in animals' plasmatic insulin was proportional to the administrated insulin dose, the ovarian response and the prolificacy, on the other hand, did not respond in a dose-dependent manner, and does treated with low dosages exhibited similar or superior performance, when compared to the high dosage treated group.

Negative effects of high levels of insulin over the reproductive performance are reported by several authors. In ewes (Downing et al. 1995), glucose infusions stimulate the ovulation rate, however they are associated to pregnancy rate reduction (Rubio et al., 1997). High glucose concentrations in the embryonic development environment may deplete the expression of glucose transporters, which leads to the activation of apoptotic pathways, cromatin degradation and nuclear fragmentation (Hinck et al., 2003), resulting in the decrease in the number of blastocyst cells and in the embryonic viability (Lea et al., 1996).

The utilization of young growing animals in our work may have exacerbated the insulinemia increase, considering the metabolic pattern sensitivity to hormonal signaling (Davie-Morel e Beck, 2003), decreasing the oocitary quality and increasing the number of non-fecundated structures. The excessive intrafollicular IGF-I stimulation and a greater glucose supply to the ovary and uterus, harms the oocitary maturation (Armstrong et al, 2003) and alters the embryonary development (Lim et al., 1999). McCaffery et al. (2000) reported significantly smaller oocytes in follicles treated with high concentrations of IGF-I. Faouladi-Nashta et al. (2005) and Adamiak et al. (2006), by using cows fed with special diets that promote extreme plasmatic insulin concentrations, observed a significantly greater number of low-quality oocytes and a smaller proportion of cleaved embryos. Souza et al., (2008) reported an increment in untransferable embryos in superovulated dams treated with propylene glycol, in a continuous manner, from synchronization to collection.

The insulin treatment did not reduce the initial gestational losses, however it allowed to maintain the pregnancy rate throughout gestation. The losses in the beginning of pregnancy (< 12 days) may have causes that are independent from insulinemia, as in cases of failure during the fertilization process or asynchrony between mating and the ovulation moment. However, progesterone profile and concentrations in the early pregnancy loss group (< 12 days) indicated the occurrence of an early luteolysis, hence, the inability to form and maintain a gestational corpus luteum.

During the pre-implantation phase, the embryonic loss may occur due to the presence of chromosomal anomalies in the oocyte and in the embryo (Gustafsson and Larsson 1983;

Viuff et al., 2001). On the other hand, the occurrence of embryony losses after this period, during the implantation phase, may be related to problems with the hormonal signaling between the conceptus and the mother, which may lead to delayed embryonic growth and/or to the inability to secrete adequate levels of INF- τ and, consequently, the occurrence of embryonic reabsorption (Spencer et al., 2004). The time of the postovulatory rise in progesterone levels and its concentration during the luteal phase regulate the synchrony between embryo and endometrium and the uterine secretions, such as proteins and growth factors, and the production of INF- τ by the conceptus (Kerbler et al. 1997), essential processes for the initial embryonic development (Sreenan et al., 2001).

A reduction in the progesterone plasmatic concentrations may slow down the embryonic growth and development rate, affecting its survival (Sreenan et al., 2001). In the present study, we observed that the progesterone concentrations in does that presented pregnancy loss, between the 12th and the 24th day of gestation, were lower than in those that maintained the pregnancy until the end, which proves the role of progesterone in the embryonic development and survival. The progesteronemia observed in the pregnant does is in accordance with a recent study performed with nulliparous milk breed does (Fonseca et al., 2005), but it differed from what was observed by Mann et al. (2003), who verified that in meat breed pregnant heifers the insulin plasmatic levels appeared to be more important during the initial embryonic development than the progesterone concentrations.

It is worth it to emphasize that the gestational losses and the pregnancy rates were inferior to those observed in mature dams (Witter et al., 1997; Greyling and Van der Nest. 2000; Dogan et al., 2005), however, we believe that this difference happened due to the use of young growing animals. Besides, these results are significant and important, considering the lack of information on extensively raised nulliparous does.

The effect of insulinemia on the reduction of losses throughout the gestational period may be associated with the embryonic development and survival. In this context, in other species, insulin has been associated with the best embryo development, during the pre-implantation phase (Gardner and Kaye, 1991; Hertogh et al., 1991; Clowes et al., 1994; Matsui et al., 1995; Ramirez et al., 1997). In super-stimulated dams, the insulin administration has favored a greater in vivo embryo production (Souza et al., 2008). In vitro studies have revealed that embryonic development may be improved, after the supplementation of the cultivation medium with insulin and IGF-I, reducing the occurrence of embryonic cells apoptosis and increasing the cleavage rate after fertilization (Byrne et al., 2002; Makarevich et al., 2002; Moreira et al., 2002; Augustin et al., 2003; Sirisathien et al., 2003). IGF-I directly

stimulates the embryo secretion of interferon tau (INF- τ) (Ko et al.,1995) and it has been positively correlated with the increase in plasmatic insulin (Totey et al., 1996; Pawshe et al., 1998; Daliri et al., 1999; Block et al., 2007). Thus, treatment with insulin associated with the increase in IGF-I intrafollicular levels, may favor the embryonic survival thru the increase in embryonic development and its ability to secrete INF- τ .

In conclusion, the insulin administration promoted an efficient reproductive response in nulliparous does, representing an useful tool for extensive management herd in tropical regions. The use of insulin during estrus synchronization improved the ovarian response and efficiently maintained the pregnancy rate, but it did not limit the embryonary losses during the initial pregnancy. Furthermore, the results showed that the reproductive response in nulliparous does is not proportional to the increment of the insulin dose, therefore, the smallest dose appeared to be the best choice.

Acknowledgements

E.S.P. Pinheiro was the recipient of a Ms.Sc. scholarship from CNPq/Brazil under advising of Prof. Davide Rondina. The authors would like to thanks the Chapadinha Farm owner Mr. and Mrs. Câmara for authorizing this experiment. The authors also extend their thanks to Mr. Zequinha and Mrs Meire for the care, handling and management of experimental animals.

References

- Adamiak, S.J., Powell,K., Rooke,J.A., Webb, R., Sinclair, K.D., 2006. Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine pos-fertilisation development of bovine oocytes in vitro. *Reproduction*. 131, 247-258.
- Amarantidis, I., Karagiannidis, A., Saratsis, Ph., Brikas, P., 2004. Efficiency of methods used for estrous synchronization in indigenous Greek goats. *Small Rumin. Res.* 52, 247–252.
- Armstrong, D.G., Gong, J.G., Webb, R., 2003. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: Physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reprod.Suppl.* 61, 403–414.
- Augustin, R., Pocar, P., Wrenzycki, C., Niemann, H., Fischer, B., 2003. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. *Reproduction*. 126, 91–99.

Bucholtz, D.C., Chiesa, A., Pappano, W.N., Nagatani, S., Tsukamura, H., Maeda, K.I., Foster, D.L., 2000. Regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion by insulin in the diabetic male lamb. *Biol. Repr.* 62, 1248–1255.

Butler, S.T., Pelton, S.H., Butler, W.R., 2004. Insulin increases 17 β -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction.* 127, 537–545

Byrne, A.T., Southgate, J., Brison, D.R., Leese, H.J., 2002. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol. Reprod. Dev.* 62, 489–495.

Clowes, E.J., Aherne, F.X., Foxcroft, G.R., 1994. Effect of delayed breeding on the endocrinology and fecundity of sows. *J. Anim. Sci.* 72, 283–291.

Crozet, N., Ahmedali, M., Dubos, M.P., 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 103, 293–298.

Daliri, M., Appa Rao, K.B.C., Kaur, G., Garg, S., Patil, S., Totey, S.M., 1999. Expression of growth factor ligand and receptor genes in preimplantation stage water buffalo *Bubalus bubalis* embryos and oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.* 177, 61–70.

Davies-Morel, M.C.G., Beck, N.F.G., 2003. A comparison of plasma growth hormone, insulin, free fatty acid and glucose concentrations during oestrus and early pregnancy in Clun Forest ewe lambs and ewe. *Small Rumin. Res.* 48, 127–134.

Dogan, I., Nur, Z., Gunay, U., Sagirkaya, H., Soylu, M.K., Sonmez, C., 2005. Estrous synchronization during the natural breeding season in Anatolian black does. *Vet. Med- Czech*, 50, 33–38.

Downing, J.A., Joss, J., Scaramuzzi, R.J., 1995. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophins and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrous cycle. *J. Endocrinol.* 146, 403–410.

- Faouladi-Nashta, A.A., Gutierrez, C.G., Garnsworthy, P.C., Webb, R. 2005. Effects of dietary carbohydrates on oocyte/embryo quality and development in lactating dairy cattle. Society for the Study of Reproduction Animal Conference.
- Fernandez-Moro, D., Veiga-Lopez, A., Ariznavarreta, C., Tresguerres, J.A.F., Encinas, T., Gonzalez-Bulnes, A., 2008. Preovulatory follicle development in goats following oestrous synchronization with progestagens or prostaglandins. *Reprod. Dom. Anim.* 43, 9–14.
- Fonseca, J.F., & Torres, C.A.A., 2005. Administration of hCG 5 days after Breeding and Reproductive Performance in Nulliparous Dairy Goats. *Reprod. Dom. Anim.* 40, 495–499.
- Gardner, H.G., Kaye, P.L., 1991. Insulin increases cell numbers and morphological development in mouse pre-implantation embryos in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 3, 79–91.
- Ginther, O.J., Kot, K., 1994. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology.* 42, 987– 1001.
- Gong, J.G., McBride, D., Bramley, T.A., 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, 157–164.
- Gong, J.G., Baxter, G., Bramley, T.A., Webb, R., 1997. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrofin: a dose response study. *J. Reprod. Fertil.* 110, 91-97.
- Gong, J.G., 2002. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Dom. Anim. Endocrinol.* 23, 229–241.
- Gonzalez-Bulnes, A., Santiago Moreno, J., Gomez-Brunet, A., Inskoop, E.K., Townsend, E.M., Lopez-Sebastian, A., 1999. Follicular dynamics during the oestrous cycle in dairy goats. *Anim. Sci.* 68, 547–554.
- Gonzales-Bulnes, A., Díaz-Delfa, C., Urrutia, B., Carrizosa, J.A., Lopez-Sebastian, A., 2004. Ultrasonografic screening of the ovulatory process in goats.. *Small Rumin. Res.* 52, 165-168.
- Goodman, R.L., & Karsh, F.J., 1980. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology.* 107, 1286-1290.

Greyling, J.P.C., Van der Nest, M., 2000. Synchronization of oestrus in goats: dose effect of progestagen. *Small Rumin. Res.* 36, 201–207.

Gustafsson, H., & Larsson, K., 1983. Reciprocal embryo transfer between repeat-breeder and virgin heifers – an experimental model. *Acta Vet. Scand.* 24, 59–64.

Harrison, L.M., & Rendel, R.D., 1986. Influence of insulin on ovulation rate, luteinizing hormone and progesterone in beef heifer. *J. Anim. Sci.* 63, 1228–1235.

Hertogh, R.D., Vanderheyden, I., Pampfer, S., Robin, D., Dufrasne, E., Delcourt, J., 1991. Stimulatory and inhibitory effects of glucose and insulin on rat blastocyst development in vitro. *Diabetes.* 40, 641–647.

Hinch, G.N., & Roelofs, J.H.W., 1986. Lupin feeding and insulin infusion during the late luteal phase can increase ovulation rate in sheep. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 18, 43 (Abstract).

Hinck, L., Thissen, J.P., De Hertogh, R., 2003. Identification of caspase-6 in rat blastocysts and its implication in the induction of apoptosis by high glucose. *Biol. Reprod.* 68, 1808–1812.

Kerbler, T.L., Buhr, M.M., Jordan, L.T., Leslie, K.E., Walton, J.S., 1997. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology.* 47, 703–714.

Khan, M.H., Agarwal, S.K., Hoque, M. Majumdar, A.C and Shankar, U., 2005. Effect of exogenous administration of insulin on follicular dynamics in goat. *Indian J. Anim. Sci.* 75, 1140-1143.

Ko, Y., Lee, C.Y., Ott, T.L., Davis, M.A., Simmen, R.C.M., Bazer, F.W., Simmen, F.A., 1991. Insulin-like growth factors in sheep uterine fluids: concentrations and relationship to ovine trophoblast protein-l production during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 45, 135–142.

Lea, R.G., Mccracken, J.E., Mcintyre, S.S., Smith, W., Baird, J., 1996. Disturbed development of preimplantation embryo in the insulin-dependent diabetic BB/E rat. *Diabetes.* 45, 1463–1470.

Letelier, C., Gonzalez-Bulnes, A., Herve, M., Correa, J., Pulido, R., 2008. Enhancement of ovulatory follicle development in maiden sheep by short-term supplementation with steam-flaked corn. *Reprod. Dom. Anim.* 43, 222–227.

Lim, J.M., Reggio, B.C., Godke, R.A., Hansel, W., 1999. Development of in-vitro-derived bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or in 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. *Human Reproduction.* 14, 458-464.

Machatkova, M., Krausova K., Jokesova E., Tomanek M., 2004. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology.* 61, 329–335.

Maffili, V.V., Torres, C.A.A., Bruschi, J.H., Fonseca, J.F., Viana, J.H.M., 2006. Estrous induction in Toggenburg goats using intravaginal devices. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58, 367-372.

Makarevich, A.V., Markkula, M., 2002. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol. Reprod.* 66, 386–392.

Majumdar, A.C., Karche, S.D., Tyagi, S., Taru Sharma, G., 1997. Effect of pretreatment with hCG and estradiol-17 β on superovulation and embryo recovery in goats. *Theriogenology.* 47,176.

Mann, G.E., Green, M.P., Sinclair, K.D., Demmers, K.J., Fray, M.D., Gutierrez,C.G., Garnsworthy, P.C., Webb, R., 2003. Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 79, 71–79.

Matsui, M., Takahashi, Y., Hishinuma, M., Kangawa, H., 1995. Stimulatory effects of insulin on the development of bovine embryos fertilized in vitro. *J. Vet. Med. Sci.* 57, 331–336.

McCaffery, F.H., Leask, R., Riley, S.C., Telfer, E.E., 2000. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers of assessment of growth and development. *Biol. Reprod.* 63, 267–273.

Meza-Herrera, C.A., Hallford, D.M., Ortiz, J.A., Cuevas, R.A., Sanchez, J.M., Salinas, H., Mellado, M., Gonzalez-Bulnes, A., 2008. Body condition and protein supplementation positively affect periovulatory ovarian activity by non LH-mediated pathways in goats. *Anim. Reprod. Sci.* 106, 412–420.

Moreira, F., Paula-Lopes, F.F., Hansen, P.J., Badinga, L., Thatcher, W.W., 2002. Effects of growth hormone and insulinlike growth factor on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*. 57, 895–907.

Motlomelo, K.C.; Greyling, J.P.C., Schwalbach, L.M.J., 2002. Synchronization of oestrus in goats: the use of different progestagen treatments. *Small Rumin. Res.* 45, 45-49.

Muñoz-Gutierrez, M., Blache, D., Martin, G., Scaramuzzi, R., 2002. Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. *Reproduction*. 124, 721–731.

Pawshe, C.H., Appa Rao, K.B.C., Totey, S.M., 1998. Effect of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotrophins on in vitro maturation and embryonic development, cell proliferation, and biosynthetic activity of cumulus-oocyte complexes and granulosa cells in buffalo. *Mol. Reprod. Dev.* 49, 277–285.

Quirin, R., Leal, T.M., Faye, B., 1994. Analysis and prevention of reproductive cycle disorders in goats in a semi-arid region in northeast Brazil. *Vet Res.* 25, 343-348.

Ramirez, J.L., Cox, N.M., Moore, A.B., 1997. Influence of exogenous insulin before breeding on conception rate and litter size of sows. *J. Anim. Sci.* 75, 1893–1898.

Ramoun, A. A., Osman, K.T., Darwish, S.A., Karen, A. M., Gamal, M.H., 2007. Effect of pretreatment with insulin on the response of buffaloes with inactive ovaries to gonadotrophin-releasing hormone agonist treatment in summer. *Reprod., Fertil. and Develop.* 19, 351–355.

Romano, J.E., 2004. Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in nubian goats. *Small Rumin. Res.* 55, 15–19.

Rondina, D., Freitas, V.J.F., Spinaci, M., Galeati, G., 2005. Effect of nutrition on plasma progesterone levels, metabolic parameters and small follicles development in unstimulated goats reared under constant photoperiod regimen. *Reprod. Dom. Anim.* 40, 548-552.

Rubianes, E., & Menchaca, A., 2003. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 271–287.

Rubio, J.M., Hallford, D.M., Hawkins, D.E., 1997. Effect of glucose administration during estrous cycle on serum hormone profiles, mRNA for steroidogenic enzymes, and breeding performance of ewes. *J. Anim. Sci.* 75, 775–780.

Sangha, G.K., Sharma, R., 2006. Quality and morphometry of goat oocytes in relation to follicular diameter and ovarian status. *Indian J. Anim. Sci.* 76, 587-590.

Sarath, T., Mehrotra, S., Agarwal, S.K., Varshney, V.P., Hoque, M., Shankar, U., Singh, S.K., 2008. Effect of insulin administration on ovarian function and estrus induction in acyclic goats. *Anim. Reprod. Sci.* 108, 216-225.

Selvaraju, S., Agarwal, S.K., Karche, S.D., Srivastava, S.K., Majumdar, A.C., Shanker, U., 2002. Fertility responses and hormonal profiles in repeat breeding cows treated with insulin. *Anim. Reprod. Sci.* 73, 141–149.

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

Shukla, S.N., Agarwal, S.K., Shankar, U., Varshney, V.P., Majumdar, A.C., 2005. Ovarian function and restoration of fertility using insulin in acyclic dairy cattle. *Indian J. Anim. Sci.* 75, 1135-1139.

Simões, J., Mascarenhas, R., 2007. Origin and characterisation of preovulatory follicles of hyperstimulated oestrous cycles in goats. *Acta Vet. Hung.* 55, 259-266.

Simpson, R.B., Chase, C.C. Jr., Spicer, L.J., Vernon, R.K., Hammond, A.C., Rae, D.O., 1994. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. *J. Reprod. and Fertil.* 102, 483–492.

Sirisathien, S., & Brackett, B.G., 2003. TUNEL analyses of bovine blastocyst after culture with EGF and IGF-1. *Mol. Reprod. Dev.* 65, 51–56.

Souza, A.L., Galeati, G., Almeida, A.P., Arruda, I.J., Govoni, N., Freitas, V.J.F. Rondina, D., 2008. Embryo production in superovulated goats treated with insulin before or after mating or by continuous propylene glycol supplementation. *Reprod. Dom. Anim.* 43, 218–221.

Spencer, T.E; Burghardt, R.C; Johnson, G.A; Bazer, F.W., 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 83, 537–550.

Sreenan, J.M., Diskin, M.G., Morris, D.G., 2001. Embryo survival in cattle, a major limitation to the achievement of high fertility. In: Diskin, M.G., (Ed.), *Fertility in the High Producing Dairy Cow*. BSAS Occasional Publication. 26, 93-104.

Stewart, R.E., Spicer, L.J., Hamilton, T.D., Keefer, B.E., 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.

Teixeira, D.I.A, Lopes-Júnior, E.S., Sousa, F.C., Pinheiro, E.S.P., Serova, I.A , Andreeva, L.E., Freitas, V.J.F., 2008. The use of real-time ultrasonography to select embryo donors participating in a transgenesis goat programme. *Small Rumin. Res.* 76, 215–219.

Thompson, J.G., 2006. The impact of nutrition on the cumulus oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants. *J. Reprod. Develop.* 52, 169–175.

Totey, S.M., Pawshe, C.H., Appa Rao, K.B.C., 1996. In vitro maturation of buffalo oocytes: role of insulin and its interaction with gonadotrophins. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 50, 113–119.

Uribe-Velasquez, L.F., Oba, E., Souza, M.I.L., 2008. Effects of exogen progesterone on follicular development in sheep. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60, 58-65.

Viuff, D., Hendriksen, P.J.M., Vos, P.L.A.M., Dieleman, S.J., Bibby, B.M., Greve, T., Hyttel, P., Thomsen, P.D., 2001. Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in in vivo-developed cattle embryos at Days 2 to 5 after ovulation. *Biol. Reprod.* 65, 204–208.

Wittek, T., Richter, A., Elze, K., 1997. Incidence of embryonic/fetal mortality and abortion in large dairy goat herd over a three year period. *Reprod. Dom. Anim.* 32, 123-123.

List of Figures

Fig. 1: Mean cumulative changes of Insulin levels according to the estrus synchronization treatment and mating of nulliparous goats untreated or treated with increasing doses of insulin. Statistically significant ($p < 0.05$) effect of Insulin treatment is given in the figure. Values are means \pm SEM.

Fig. 2: Ovulatory follicle size (mm) and number of ovulation according to the time from estrus onset (hours) in nulliparous goats untreated or treated with increasing doses of insulin ($n = 15$). a,b $p < 0.05$ comparison between groups. For preovulatory follicle, values are expressed as mean \pm SEM and statistically significant ($p < 0.05$) effect of Insulin treatment is given in the figure.

Fig. 3: Progesterone levels in pregnant nulliparous does untreated or treated with increasing doses of insulin, progesterone levels in animals that presented pregnancy loss $>$ or $<$ 12 days after mating. Pregnancy loss (%) (Right) according to the days after mating. Statistically significant ($p < 0.05$) effect of Insulin treatment is given in the figure. For progesterone concentration, values are expressed as mean \pm SEM.

List of Tables

Table 1. Estrus and ovarian responses in nulliparous does untreated or treated with increasing doses of insulin. Values are given as mean \pm SEM.

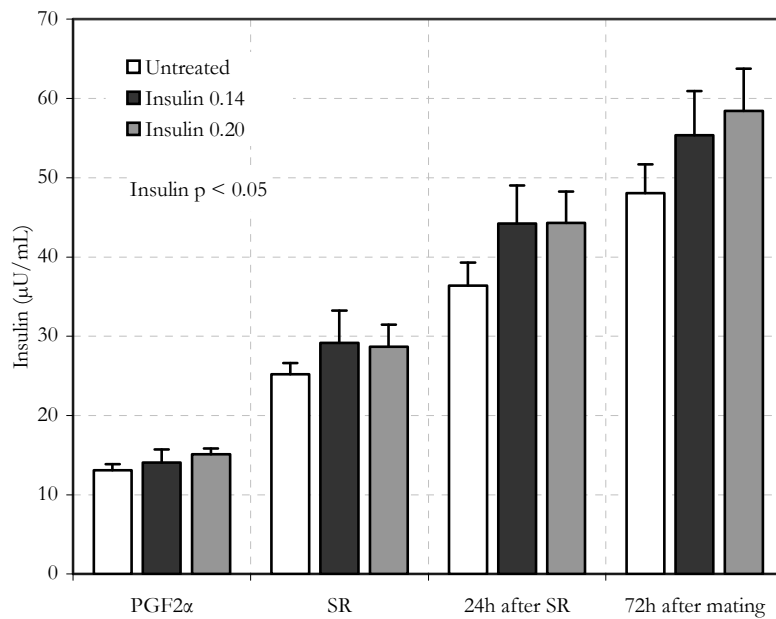


Figure 1: Mean cumulative changes of Insulin levels according to the estrus synchronization treatment and mating of nulliparous goats untreated or treated with increasing doses of insulin. Statistically significant ($p < 0.05$) effect of Insulin treatment is given in the figure. Values are means \pm SEM. (SR: Sponge Removal)

Table 1. Estrus and ovarian responses in nulliparous does untreated or treated with increasing doses of insulin. Values are given as mean \pm SEM.

Parameters	Insulin Doses			Significance
	Untreated	Insulin 0.14 UI	Insulin 0.20 UI	
<i>Oestrus response</i>				
Estrus % (n/n)	84.62 (11/13)	69.23(9/13)	69.23(9/13)	NS
Estrus length (h)	33.36 \pm 2.18	38.78 \pm 3.14	34.44 \pm 2.30	NS
SR – OE (h)	36.27 \pm 4.59	31.67 \pm 3.81	28.78 \pm 2.55	NS
SR – Ov (h)	58.20 \pm 4.80	60.60 \pm 3.60	59.00 \pm 3.35	NS
OE – Ov (h)	28.80 \pm 2.24	30.00 \pm 2.68	29.00 \pm 1.84	NS
<i>Ovarian response</i>				
Maximum diameter POF (mm)	7.20 \pm 0.57	7.76 \pm 0.36	6.17 \pm 0.56	NS
Ovulatory rate (n)	1.00 \pm 0.21a	1.77 \pm 0.22b	1.62 \pm 0.24b	**
Diameter of corpora lutea (mm)	5.16 \pm 1.02a	6.80 \pm 1.10b	5.64 \pm 0.87a	**

NS, not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

SR: Sponge removal

OE: Onset of the estrus

Ov: Ovulation

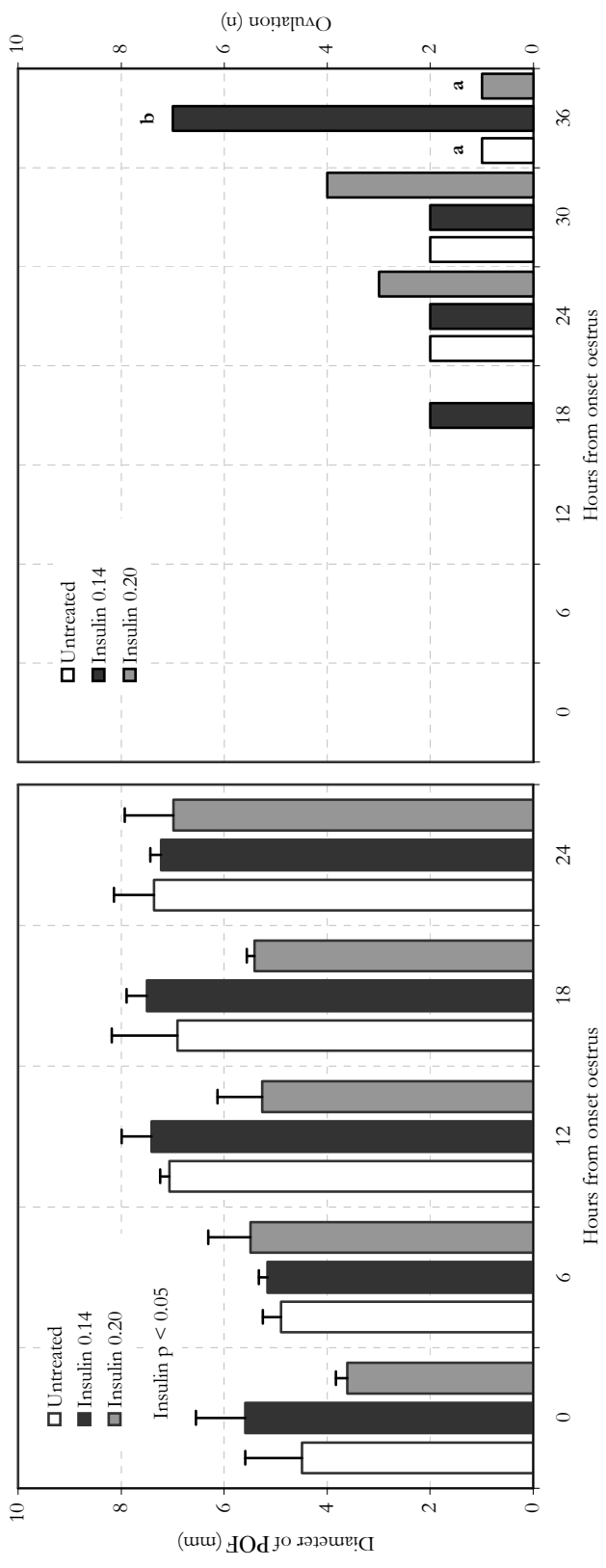


Figure 2: Ovulatory follicle size (mm) and number of ovulation according to the time from estrus onset (hours) in nulliparous goats untreated or treated with increasing doses of insulin (n = 15). a,b p < 0.05 comparison between groups. For preovulatory follicle (POF), values are expressed as mean ± SEM and statistically significant (p < 0.05) effect of Insulin treatment is given in the figure.

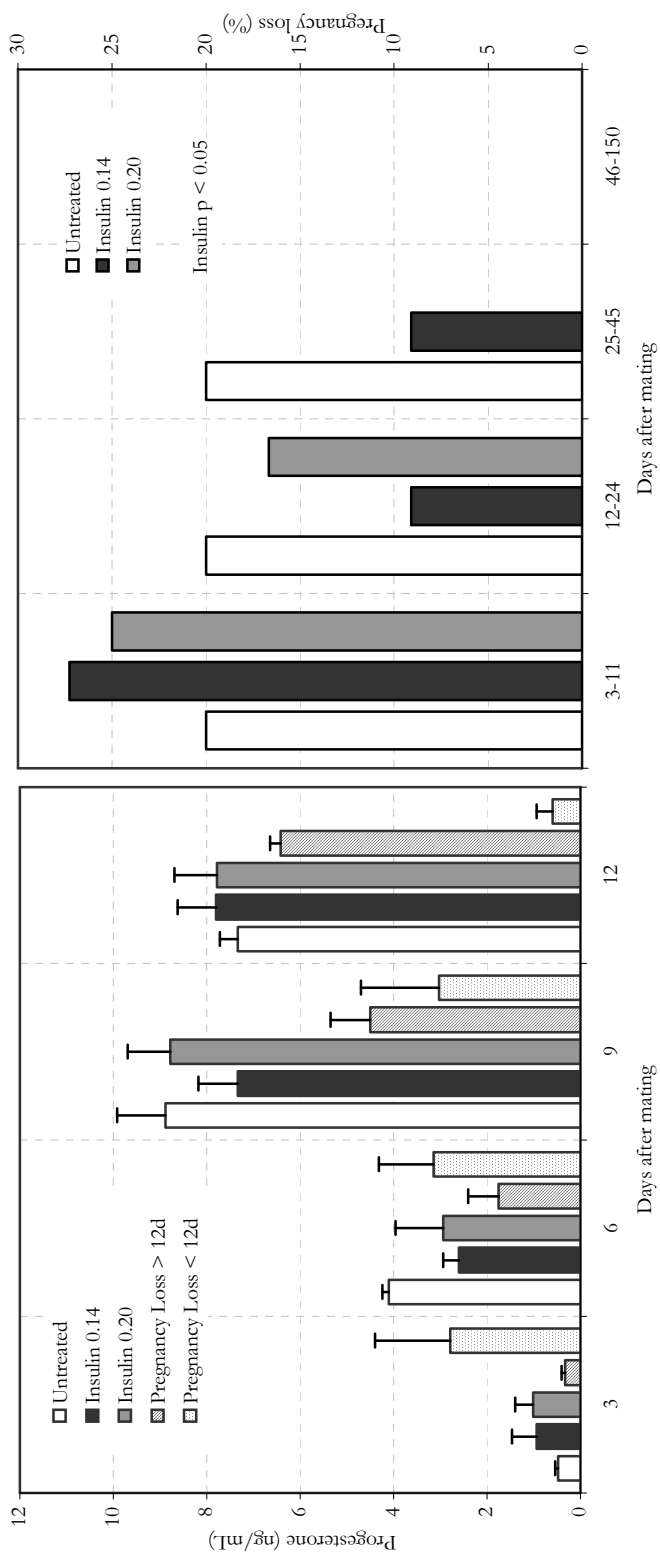


Figure 3: Progesterone levels in pregnant nulliparous does untreated or treated with increasing doses of insulin, progesterone levels in animals that presented pregnancy loss $>$ or $<$ 12 days after mating. Pregnancy loss (%) (Right) according to the days after mating. Statistically significant ($p < 0.05$) effect of Insulin treatment is given in the figure. For progesterone concentration, values are expressed as mean \pm SEM.

8 CONCLUSÕES GERAIS

A utilização de insulina em doses crescentes em cabras nulíparas não afetou significativamente a resposta ao tratamento de sincronização de estro, mas induziu uma melhor resposta ovariana. Embora não tenha sido observada uma resposta proporcional ao aumentar a dosagem de insulina, a aplicação de 0,14UI/kg PV/dia destacou-se como o melhor tratamento.

Em adição, a administração da insulina mostrou-se eficaz durante a gestação reduzindo significativamente a perda embrionária, entretanto não influenciou a taxa de prolificidade.

9 PERSPECTIVAS

Nossos resultados deixam a perspectiva da utilização dos protocolos testados no manejo reprodutivo em cabras nulíparas, entretanto pesquisas adicionais devem ser desenvolvidas a fim de se verificar outras dosagens de administração de insulina e, também, aplicadas em outros estágios reprodutivos, buscando maximizar a resposta dos animais tratados.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA, J.A.; SOSA, C.; FORCADA, F.; MEIKLE, A. The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 367–378, 2006.

ABECIA JA, FORCADA F, LOZANO JM. A preliminary report on the effect of dietary energy on prostaglandin F-2 alpha production in vitro, interferon-tau synthesis by the conceptus, endometrial progesterone concentration on days 9 and 15 of pregnancy and associated rates of embryo wastage in ewes. *Theriogenology*. 52: 1203–1213, 1999.

ABECIA JA, LOZANO JM, FORCADA F, ZARAZAGA L. Effect of the level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Anim Reprod Sci.* 48: 209–218, 1997.

ADAMIAK, S.J; POWELL,K.; ROOKE,J.A.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine pos-fertilisation development of bovine oocytes *in vitro*. *Reproduction*. 131:247-258, 2006.

AHMAD, N., E. C. TOWNSEND, R. A. DAILEY, AND E. K. INSKEEP. 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. 1997.

AHMAD, N., F. N. SCHRICK, R. L. BUTCHER, E. K. INSKEEP. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. Reprod.* 52:1129–1135, 1995.

AL-MUFTI W, BOMSEL-HELMREICH O, CHRISTIDES JP. Oocyte size and intrafollicular position in polyovular follicles in rabbits. *J Reprod Fertil.* 82:15–25, 1988.

ANTHONY RV, SCHEAFFER AV, WRIGHT CD, REGNAULT TR. Ruminant models of prenatal growth restriction. *Reprod Suppl.* 61:183–194,2003.

ARIAS, P; RODRIGUEZ M; SZWARCFARB B; SINAY IR, MOGUILVSKY J. Effect of insulin on LHRH release by perifused hypothalamic fragments. *Neuroendocrinology.* 56: 415–418, 1992.

ARMSTRONG DG, BAXTER G, HOGG CO, WOAD KJ. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reproduction.* 123:789–97, 2002a.

ARMSTRONG, D.G.; GONG, J.G.; WEBB, R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: Physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reprod. Suppl.* 61:403–414, 2003.

ARMSTRONG, D.G.; GONG, J.G.; GARDNER, J.O.; BAXTER, G.; HOGG, C.O.; WEBB, R. 2002b. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction.* 123: 371–378, 2002b.

ASHWORTH, C.J. Effect of pre-mating nutritional status and post-mating progesterone supplementation on embryo survival and conceptus growth in gilts. *Anim. Reprod. Sci.* 26: 311, 1991.

ASHWORTH, C.J. Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livest. Prod. Sci.* 44: 99-105, 1995.

AUGUSTIN R, POCAR P, WRENZYCKI C, NIEMANN H, FISCHER B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. *Reproduction.* 126:91–9, 2003.

BASRUR, P. K., REYES, E. R., FARAZMAND, A., KING, W. A. AND POPESCU, P. C. X-autosome translocation and low fertility in a family of crossbred cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 67: 1–16, 2001.

BAKR, A. A. and RAMOUN, A. A. Effect of dietary energy on response of buffaloes with smooth inactive ovaries to gonadotrophin releasing hormone injection. *Assuit Vet. Med. J.* 42, 13–23, 2000.

BEAM SW and BUTLER WR. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 54: 411–424, 1999.

BERARDINELLI JG, WENG J, BURFENING PJ, ADAIR R. Effect of excess degradable intake protein on early embryonic development, ovarian steroids, and blood urea nitrogen on days 2, 3, 4, and 5 of the estrous cycle in mature ewes. *J. Anim. Sci.* 79: 193–199, 2001.

BERGFELD, E.G.M., KOJIMA, F.N., CUPP, A.S., WEHRMAN, M.E., PETERS, K.E., MARISCAL, V., SANCHEZ, T., KINDER, J.E. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 α -estradiol in bovine females. *Biol. Reprod.* 54: 546–553, 1996.

BILODEAU-GOESEELS, S. E KASTELIC, J. P. Factors affecting embryo survival and strategies to reduce embryonic mortality in cattle. *Canadian J. Anim. Sci.* 83: 659–671, 2003.

BOLAND MP, LONERGAN P, O'CALLAGHAN D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*. 55: 1323–1340, 2001.

BONDY CA, CHIN E, ZHOU J. Significant species differences in local IGF-I -II gene expression. *Adv Exp Med Biol*. 343: 73–77, 1993.

BLOCK, S.S.; BUTLER, W.R.; EHRHARDT, R.A.; BELL, A.W.; VAN AMBURGH, M.E.; BOISCLAIR, Y.R. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance, *J. Endocrinol*. 171: 339-348, 2001.

BLOOMFIELD FH, OLIVER MH, HAWKINS P, CAMPBELL M, PHILLIPS DJ, GLUCKMAN PD. A periconceptual nutritional origin for noninfectious preterm birth. *Science*. 300:606, 2003.

BREUEL, K. F., P. E. LEWIS, F. N. SCHRICK, A. W. LISHMAN, E. K. INSKEEP, AND R. L. BUTCHER. Factors affecting fertility in the postpartum cow: role of the oocyte and follicle in conception rate. *Biol. Reprod*. 48:655–661,1993b.

BUCHOLTZ DC; CHIESA A; PAPPANO WN; NAGATANI S; TSUKAMURA H; MAEDA KI and FOSTER DL. Regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion by insulin in the diabetic male lamb. *Biol. Reprod*. 62: 1248–1255, 2000.

BUTLER, W. R., CALAMAN, J. J. AND BEAM, S. W. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J. Anim. Sci*. 74: 858–865, 1996.

BUTLER, W. R. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci*. 81: 2533–2539, 1998.

BYRNE AT, SOUTHGATE J, BRISON DR, LEESE HJ. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol. Reprod. Dev*. 62:489–95, 2002.

CAMPBELL BK. Factors affecting ovulation rate in sheep and cattle. PhD thesis University of Sydney, 1988.

CHAGAS E SILVA, J., LOPES DA COSTA, L. AND ROBALO SILVA J. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in cattle. *Theriogenology*. 58: 51–59, 2002.

COFFEY, M.T., BRITT, J.H. Enhancement of sow reproductive performance by beta-carotene or vitamin A. *J. Anim. Sci.* 71: 1198–1202, 1993.

CONSTANCIA M, HEMBERGER M, HUGHES J, DEAN W, FERGUSON-SMITH A, FUNDELE R, et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*. 417:945–948, 2002.

DELGADILLO, J. A.; MALPAUX, B. Reproduction of goats in the tropics and subtropics. In: Proc. 6th Int. Conf. on Goats, Beijing, China. 2:785–793, 1996.

DISKIN, M.G.; MACKEY, D.R.; ROCHE, J.F.; SREENAN, J.M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78:345–370, 2003.

DISKIN, M.G.; MURPHY, J.J.; SREENAN, J.M. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 96: 297–311, 2006.

DOWNING, J. A.; SCARAMUZZI, R. J. The effect of infusion of insulin during the luteal phase of the estrous cycle on the ovulation rate and on plasma concentrations of LH, FHS and glucose in ewes. *Theriogenology*. 47:747-759, 1997.

DOWNING, J.A.; JOSS, J.; CONNELL, P.; SCARAMUZZI, R.J. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrus cycle. *J. Endocrinol.* 146:403-410, 1995.

DUNNE, L.D., DISKIN, M.G., BOLAND, M.P., O'FARRELL, K.J., SREENAN, J.M. The effects of pre-and post-insemination plane of nutrition on embryo survival in beef heifers. *Anim. Sci.* 69:411–417, 1999.

ECHTERNKAMP, S.E.; SPICER, L.J.; GREGORY, K.E.; CANNING, S.F.; HAMMOND, J.M. Concentration of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biol. Reprod.* 43:8-14, 1990.

EDWARDS LJ, MCMILLEN IC. Periconceptual nutrition programs development of the cardiovascular system in the fetal sheep. *Am. J. Physiol.* 283:669–679, 2002.

ELROD, C.C., BUTLER, W.R. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J. Anim. Sci.* 71: 694–701, 1993.

ELROD, C.C., VAN AMBURGH, M., BUTLER, W.R. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. *J. Anim. Sci.* 71: 702–706, 1993.

FAHEY, J., BOLAND, M. P. AND O'CALLAGHAN, D. Effects of dietary urea on embryo development in superovulated donor ewes and on embryo survival following transfer in recipient ewes. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*: 182 (Abstr.), 1998.

FOSTER, D.L.; NAGATANI, S. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. *Biol. Reprod.* 60: 205–215, 1999.

FOULADI-NASHTA, A.A.; GUTIERREZ, C.G; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Effects of dietary carbohydrates on oocyte/embryo quality and development in lactating dairy cattle. *Society for the Study of Reproduction Animal Conference*, 2005.

FOULADI-NASHTA, A.A.; GUTIERREZ, C.G; GONG, J.G; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. *Biol. Reprod. IN PRESS*, 2007.

GARNSWORTHY, P.C.; FOULADI-NASHTA, A.A.; MANN, G.E; SINCLAIR, K.D; ARMSTRONG, D.G; GONG, J.G.; GUTIERREZ, C.G.; and WEBB, R. How does nutrition interact with fertility in dairy cows? *Cattle Practice*. 16, 2008.

GATH, V. P., LONERGAN, P., BOLAND, M. P. AND O'CALLAGHAN, D. Effect of diet type on establishment of pregnancy and embryo development in heifers. *Theriogenology*. 51: 224 (Abstr.), 1999.

GONG JG. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23: 229–241, 2002.

GOPALAKRISHNAN GS, GARDNER DS, RHIND SM, RAE MT, KYLE CE, BROOKS AN. Programming of adult cardiovascular function after early maternal undernutrition in sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287:12–20, 2004.

GREVE T, CALLESEN H, HYTTEL P, HØIER R, ASSEY R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*. 43:41–50, 1995.

GUTIERREZ CG; CAMPBELL BK and WEBB R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol. Reprod.* 56: 608–616, 1997.

HAMMON, D. S., WANG, S. AND HOLYOAK, G. R. Ammonia concentration in bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on subsequent embryo development. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 1–8, 2000.

HARE, W. C. D., SINGH, E. L., BETTERIDGE, K. J., EAGLESOME, M. D., RANDALL, G. C. B., MITCHELL, D., BILTON, R. J. AND TROUNSON, A. O. Chromosomal analysis of 159 bovine embryos collected 12 to 18 days after estrus. *Can. J. Genet. Cytol.* 22: 615–626, 1980.

HARNEY, J.P., OTT, T.L., GEISERT, R.D. AND BAZER, F.W. Retinolbinding protein gene expression in cyclic and pregnant endometrium of pigs, sheep and cattle. *Biol. Reprod.*, 49: 1066-1073, 1993.

HARRISON, L.M.; RANDEL, R.D. Influence of insulin and energy intake on ovulation rate, luteinizing hormone and progesterone in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 63:1228–1235, 1986.

HERNANDEZ ER. Regulation of the genes for insulin-like growth factor (IGF) I and II and their receptors by steroids and gonadotropins in the ovary. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 53: 219–221, 1995.

HINCK, L.; THISSEN, J.P.; DE HERTOOGH, R. Identification of caspase-6 in rat blastocysts and its implication in the induction of apoptosis by high glucose. *Biol. Reprod.* 68:1808–1812, 2003.

HINEY, J.K., OJEDA, S.R., DEES, W.L. Insulin-like growth factor-I, a possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. *Neuroendocrinology.* 57:420–423, 1991.

HOSTETLER, C.E; KINCAID, R.L; MIRANDO, M.A. The role of essential trace elements in embryonic and fetal development in livestock. *The Vet. J.* 166: 125–139, 2003.

HOUSEKNECHT, K.L.; BAILE, C.A.; MATTERI, R.L.; SPURLOCK, M.E. The biology of leptin: a review. *J. Anim. Sci.* 76:1405-1420, 1998.

HYTTEL, P., VIUFFE, D., FAIR, T., LAURINCIK, J., THOMSEN, P. D., CALLESEN, H., VOS, P. L. A. M., HENDRIKSEN, P. J. M., DIELEMAN, S. J., SCHELLANDER, K., BESENFELDER, U.

AND GREVE, T. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction*. 122: 21–30, 2001.

INSKEEP, E.K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J. Anim. Sci.* 82:24–39, 2004.

INSKEEP, E. K. Embryo toxic effects adjacent and opposite to the early regressing bovine corpus luteum. *Theriogenology*. 54: 83–91, 2000.

JAMES, L. F., PANTER, K. E., NIELSEN, D. B. AND MOLYNEUX, R. J. The effect of natural toxins on reproduction in livestock. *J. Anim. Sci.* 70: 1573–1579, 1992.

JORRITSMA, R; WENSING, T.; KRUIP, T.A.M.; VOS, P.L.A.M.; NOORDHUIZEN, J.P.T.M. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet. Res.* 34: 11-26, 2003.

LEA, R.G.; MCCRACKEN, J.E.; MCINTYRE, S.S.; SMITH, W.; BAIRD, J. Disturbed development of preimplantation embryo in the insulin-dependent diabetic BB/E rat. *Diabetes*. 45: 1463–1470, 1996.

LEEUWENBERG BR, HURST PR, MCNATTY KP. Expression of IGF-I mRNA in the ovine ovary. *J. Mol. Endocrinol.* 15: 251–258, 1995.

LIM, J.M; REGGIO, B.C.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. Development of in-vitro-derived bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or in 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. *Hum. Reprod.* 14: 458-464, 1999.

LONERGAN P, RIZOS D, GUTIE'RREZ-ADA'N A, MOREIRA PM, PINTADO B, DE LA FUENTE J, et al. Temporal Divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.* 69:1424–31, 2003.

LOZANO JM, LONERGAN P, BOLAND MP, O'CALLAGHAN D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and postfertilization development. *Reproduction*. 125: 543–553, 2003.

LOZANO JM, ABECIA JA, FORCADA F, ZARAZAGA L, ALFARO B. Effect of undernutrition on the distribution of progesterone in the uterus of ewes during the luteal phase of the estrous cycle. *Theriogenology*. 49: 539–546, 1998.

MANN, G.E.; GREEN, M.P.; SINCLAIR, K.D.; DEMMERS, K.J.; FRAY, M.D.; GUTIERREZ, C.G.; GARNSWORTHY, P.C. ; WEBB R. Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 79: 71–79, 2003.

MATTOS, R., STAPLES, C. R., WILLIAMS, J., AMOROCHO, A., MCGUIRE, M. A. AND THATCHER, W. W. Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of menhaden fish meal. *J. Dairy Sci.* 85: 755–764, 2002.

MARTINEZ, M.F.; BOSCH, R.A. Determination of the early pregnancy and embryonic growth by transrectal ultrasound scanning. *Theriogenology.* 49: 1555-1565, 1998.

MAKAREVICH AV, MARKKULA M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Bio. Reprod.* 66:386–92, 2002.

MAMLUK R; GREBER Y and MEIDAN R. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid expression for steroidogenic factor-1, steroidogenic acute regulatory protein, and cytochrome P450 side-chain cleavage in bovine luteal cells. *Biol. Reprod.* 60: 628–634, 1999.

MARTIN GB, MILTON JTB, DAVIDSON RH, BANCHERO HUNZICKER GE, LINDSAY DR, BLACHE D. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83: 231–245, 2004.

MATAMOROS, I.A.; COX, N.M.; MOORE, A.B. Effects of exogenous insulin and body condition on metabolic hormones and gonadotropin-induced follicular development in prepuberal gilts. *J. Anim. Sci.* 69: 2081-2091, 1991.

MCCAFFERY F.H., LEASK R., RILEY S.C., TELFER E.E. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers of assessment of growth and development. *Biol. Reprod.* 63:267–73, 2000.

MCEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J.; ASHWORTH, C.J.; ROOKE, J.A.; SINCLAIR, K.D. Feed and forage toxicants affecting embryo survival and fetal development. *Theriogenology.* 55: 113–129, 2001.

MCEVOY T.G, ROBINSON J.J, AITKEN R.P, FINDLAY P.A, PALMER R.M., ROBERTSON I.S. Dietary-induced suppression of preovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent in vivo and in-vitro development of their ova. *Anim. Reprod. Sci.* 39: 89–107, 1995.

MCEVOY TG, ROBINSON JJ, AITKEN RP, FINDLAY PA, ROBERTSON IS. Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. *Anim. Reprod. Sci.* 47: 71–90, 1997.

MCGUIRE, M.A., DWYER, D.A., HARRELL, R.J., BAUMAN, D.E. Insulin regulates circulating insulin-like growth factors and some of their binding proteins in lactating cows. *Am. J. Physiol.* 269: 723–730, 1995.

MCNEILL, R.E., SREENAN, J.M., DISKIN, M.G., CAIRNS, M.T., FITZPATRICK, R., SMITH, T.J., MORRIS, D.M. Effect of progesterone concentration on the expression of progesterone-responsive genes in the bovine endometrium during the early luteal phase. *Reprod. Fertil. Develop.* 18:573–583, 2006.

MEDINA, C.L.; NAGATANI, S.; DARLING, T.A.; BUCHOLTZ, D.C.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K.I.; FOSTER, D.L. Glucose availability modulates the timing of the luteinising hormone surge in the ewe. *J. Endocrinol.* 10: 785–792, 1998.

MELLOR D.J. Nutritional and placental determinants of foetal growth rate in sheep and consequences for the newborn lamb. *Br. Vet. J.* 139:307–324, 1983.

MIHM, M., N. CURRAN, P. HYTTEL, P. G. KNIGHT, M. P. BOLAND, AND J. F. ROCHE. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in beef heifers. *J. Reprod. Fertil.* 116:293–304, 1999.

MONGET, P.; MARTIN, G.B. Involvement of insulin-like growth factor in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Human Reprod.* 12: 33–52, 1997.

MUÑOZ-GUTIÉRREZ M, BLACHE D, MARTIN GB, SCARAMUZZI RJ. Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. *Reproduction.* 124: 721– 731, 2002.

MUÑOZ-GUTIÉRREZ M, BLACHE D, MARTIN GB, SCARAMUZZI RJ. Ovarian follicular expression of mRNA encoding the type I insulin like growth factor receptor (IGF-IR) and insulin like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine or supplementary feeding with lupin grain. *Reproduction.* 128: 1–11, 2004.

MUÑOZ-GUTIÉRREZ M, FINLAY P, ADAM CL, WAX G, CAMPBELL BK, KENDALL NR, KHALID M, FORSBERG M, SCARAMUZZI RJ. The effect of leptin on folliculogenesis and the follicular expression of mRNA encoding aromatase, IGF-IR, IGFBP-2, IGFBP-4, IGFBP-5, leptin receptor and leptin in ewes. *Reproduction*. 130: 869–881, 2005.

MURPHY MG, ENRIGHT WJ, CROWE MA, MCCONNELL K, SPICER LJ, BOLAND MP, ROCHE JF. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *J. Reprod. Fertil.* 92: 333–338, 1991.

NEUVIANS TP, PFAFFLMW, BERISHA B, SCHAMS D. The mRNA expression of the members of the IGF-system in bovine corpus luteum during induced luteolysis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 25:359–72, 2003.

NOLAN, R., DUFFY, P., WADE, M., O'CALLAGHAN, D. AND BOLAND, M. P. Effect of quantity and type of diet and frequency of trans-vaginal ovum aspiration on in vitro embryo development in heifers. *Theriogenology*. 49: 402 (Abstr.), 1998.

O'CALLAGHAN D., WADE, M. G. AND BOLAND, M. P. Effect of urea and an ammonia-binding agent in vivo on subsequent development of bovine oocytes cultured in vitro. *Ir. J. Agric. Food Res.* 36: 123–124, 1997.

OLAUSSON H, SOHLSTROM A. Effects of food restriction and pregnancy on the expression of insulin-like growth factors-I and -II in tissues from guinea pigs. *J. Endocrinol.* 179:437–445, 2003.

PARR R.A., DAVIS I.F., FAIRCLOUGH R.J., MILES M.A. Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 80: 317–320, 1987.

PARR R.A., DAVIS I.F., MILES M.A., SQUIRES T.J. Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Res. Vet. Sci.* 55: 306–310, 1993.

PARR R.A., WILLIAMS A.H., CAMPBELL I.P., WITCOME G.F., ROBERTS A.M. Low nutrition of ewes in early pregnancy and the residual effect on the offspring. *J. Agric. Sci.* 106:81–87, 1986.

PERKS C.M., PETERS A.R., WATHES D.C. Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* 116:157–65, 1999.

PETIT, H.V., DEWHURST, R.J., PROULX, J.G., KHALID, M., HARESIGN, W., TWAGIRAMUNGU, H. Milk production, milk composition, and reproductive function of dairy cows fed different fats. *Can. J. Anim. Sci.* 81: 263–271, 2001.

POPESCU, C. P. and PECH, A. Cattle 1/29 translocation in the world (1964–1990): a review. *Ann. Rev. Zootech.* 40: 271–305, 1991.

PRELLE K., STOJKOVIC M., BOXHAMMER K., MOTLIK J., EWALD D., ARNOLD G.J. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and long R3IGF-I differently affect development and messenger ribonucleic acid abundance for IGFbinding proteins and type I IGF receptors in in vitro produced bovine embryos. *Endocrinology.* 142: 1309–16, 2001.

QUINLIVAN, T.D., MATTIN, C.A., TAYLOR, W.B., CAIMEY, I.M. Estimates of pre- and perinatal mortality in the New Zealand Romney Marsh ewe. *J. Reprod. Fertil.* 11: 379-390, 1966.

RAMOUN, A. A.; OSMAN, K.T.; DARWISH, S. A.; KAREN, A. M., GAMAL, M. H. Effect of pretreatment with insulin on the response of buffaloes with inactive ovaries to gonadotrophin-releasing hormone agonist treatment in summer. *Reprod. Fertil. Develop.* 19, 351–355, 2007.

REDMER .D.A, WALLACE, J.M., REYNOLDS, L.P. .Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. *Dom. Anim. Endocrinol.* 27:199-217, 2004.

REVAH, I., AND W. R. BUTLER. Prolonged dominance of follicles reduces the viability of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 106:39–47, 1996.

REYNOLDS LP, REDMER DA. Utero-placental vascular development and placental function. *J. Anim. Sci.* 73:1839–1851, 1995.

ROBINSON, J.J.; ASHWORTH, C.J.; ROOKE, J.A.; MITCHELL, L.M.; MCEVOY, T.G. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126: 259–276, 2006.

ROCHE, J.F.; DISKIN, M.G. Hormonal regulation of reproduction and interactions with nutrition in female ruminants. In: Proceedings of the Eighth International Symposium on Ruminant Physiology, September 1994, Willengen, Germany, 1994.

RUBES, J., MACHATKOVÁ, M., JOKESOVÁ, E., ZUDOVÁ, D. A potential relationship between the 16;20 and 14;20 Robertsonian translocations and low in vitro embryo development. *Theriogenology*. 52: 171–180, 1999.

RUSSEL A.J.F., FOOT J.Z., WHITE I.R. The effect of weight at mating and of nutrition during mid-pregnancy on the birthweight of lambs from primiparous ewes. *J Agric. Sci.* 97:723–729, 1981.

SAMARAS S.E., GUTHRIE H.D., BARBER J.A., HAMMOND J.M. Expression of the mRNAs for the insulin-like growth factors and their binding proteins during development of porcine ovarian follicles. *Endocrinology*. 133: 2395–2398, 1993.

SANCHEZ T., WEHRMAN M.E., KOJIMA F.N., CUPP A.S., BERGFELD E.G., PETERS K.E, MARISCAL V., KITTOCK R.J., KINDER J.E. Dosage of the synthetic progestin, norgestomet, influences luteinizing hormone pulse frequency and endogenous secretion of 17β -estradiol in heifers. *Biol. Reprod.* 52:464–469, 1995.

SARATH, T.; MEHROTRA, S.; AGARWAL, S.K.; VARSHNEY, V.P.; HOQUE, M.; SHANKAR, U. AND SINGH, S.K. Effect of insulin administration on ovarian function and estrus induction in acyclic goats. *Anim. Reprod. Sci.* 108:216-225, 2008.

SAVIO, J. D., W. W. THATCHER, L. BADINGA, R. L. de LA SOTA, D. WOLFENSON..Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J. Reprod. Fertil.* 97:197–203, 1993a.

SAVIO, J. D., W. W. THATCHER, G. R. MORRRIS, K. ENTWISTLE, M. DROST, M. R. MATTIACCI. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 98:77–84, 1993b.

SAUERWEIN H, MIYAMOTO A, GU'N'THER J, MEYER HH, SCHAMS D. Binding and action of insulin-like growth factors and insulin in bovine luteal tissue during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 96:103–15, 1992.

SCARAMUZZI R.J., CAMPBELL B.K., SOUZA C.J.H., BAIRD D.T. Glucose uptake and lactate production by the autotransplanted ovary during the luteal and follicular phases of the oestrous cycle. In: Proceedings of the 6th International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants, *Abstract*, 2002.

SCARAMUZZI R.J., CAMPBELL B.K., DOWNING J.A., KENDALL N.R., KHALID M., MUÑOZ-GUTIÉRREZ M, SOMCHIT A. A review of the affects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod. Nutr. Dev.* 46:339-354,2006.

SELVARAJU, S. ; AGARWAL, S.K., KARCHE, S.D., SRIVASTAVA, S.K., MAJUMDAR, A.C., SHANKER, U. Fertility responses and hormonal profiles in repeat breeding cows treated with insulin. *Anim. Reprod. Sci.* 73: 141–149, 2002.

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

SHAHAM-ALBALANCY, A., Y. FOLMAN, M. KAIM, M. ROSENBERG, and D. WOLFENSON. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF 2α secretion in the subsequent oestrous cycle. *Reproduction.* 122:643–648, 2001.

SIMPSON, R.B.; CHASE, C.C.; JR., SPICER; L.J, VERNON, R.K.; HAMMOND, A.C.; RAE, D.O. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated angus an brahman cows. *J. Reprod.Fertil.* 102: 483-492, 1994.

SIRISATHIEN S, HERNANDEZ-FONSECA HJ, BRACKETT BG. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. *Anim Reprod Sci.* 77:21–32, 2003.

SMITH, L. C., OLIVERA-ANGEL, M., GROOME, N. P., BHATIA, B. And C. A. PRICE. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 106: 193–199, 1996.

SMITH, M. W., AND J. S. STEVENSON. Fate of the dominant follicle, embryonal survival, and pregnancy rates in dairy cattle treated with prostaglandin F 2α and progestins in the absence or presence of a functional corpus luteum. *J. Anim. Sci.* 73:3743–3751, 1995.

SOLDANI, R., CAGNACCI, A., PAOLETTI, A.M., YEN, S.S., MELIS, G.B. Modulation of anterior pituitary luteinizing hormone response to gonadotropin-releasing hormone by insulin-like growth factor I in vitro. *Fertil. Steril.* 64: 634–637, 1995.

SPENCER, T.E.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83: 537–550, 2004.

SPICER, L.J.; STEWART, R.E. Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. *Biol.Reprod.* 54: 255-263, 1996.

SPICER, L.J., ALPIZAR, E., ECHTERNKAMP, S.E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotrophins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and or insulin-like growth factor I production in vitro. *J. Anim. Sci.* 71:1232–1241, 1993.

SREENAN, J.M., DISKIN, M.G., MORRIS, D.G. Embryo survival in cattle, a major limitation to the achievement of high fertility. In: Diskin, M.G., (Ed.), *Fertility in the High Producing Dairy Cow. BSAS Occasional Public..* 26: 93-104, 2001.

STARBUCK, G.R., DARWASH, A.O., MANN, G.E., LAMMING, G.E. The detection and treatment of post insemination progesterone insufficiency in dairy cows. In: Diskin, M.G., (Ed.), *Fertility in the High Producing Dairy Cow. BSAS Occasional Public..* 26:447–450, 2001.

STEWART, R.E., SPICER, L.J., HAMILTON, T.D., KEEFER, B.E. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. *J. Anim. Sci.* 73: 3719–3731, 1995.

STOCK A.E., FORTUNE J.E. Ovarian follicular dominance: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology.* 132:1108–1114, 1993.

SYMMONDS ME, MOSTYN A, PEARCE S, BUDGE H, STEPHENSON T. Endocrine and nutritional regulation of fetal adipose tissue development. *J Endocrinol.* 179:293–299, 2003.

TOWNSON, D. H., P. C. W. TSANG, W. R. BUTLER, M. FRAJBLAT, L. C. GRIEL, JR., C. J. JOHNSON, R. A. MILVAE, G. M. NIKSIC, J. L. PATE. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 80:1053–1058, 2002.

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

VELAZQUEZ, M.A.; NEWMAN M.; CHRISTIE, M.F.; CRIPPS, P.J. ; CROWE, M.A.; SMITH, R.F. ; DOBSON ,H. *Theriogenology*. 64: 1977–1994, 2005.

VIÑOLES C, FORSBERG M, MARTIN GB, CAJARVILLE C, REPETTO J, MEIKLE A. Shortterm nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction*. 129: 299–309, 2005.

VIÑOLES GC. Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. PhD thesis Swedish University of Agricultural Sciences, 2003.

VIUFF, D., HENDRIKSEN, P. J. M, VOS, P. L. A. M., DIELEMAN, S. J., BIBBY, B. M., GREVE, T., HYTTEL, P., THOMSEN, P. D. Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in in vivo-developed cattle embryos at Days 2 to 5 after ovulation. *Biol. Reprod.* 65: 204–208, 2001.

VIUFF, D., RICKORDS, L., OFFENBERG, H., HYTTEL, P., AVERY, B., GREVE, T., OLSAKER, I., WILLIAMS, J. L., CALLESEN, H. AND THOMSEN, P. D. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biol. Reprod.* 60: 1273–1278, 1999.

VIUFF, D., GREVE, T., AVERY, B., HYTTEL, P., BROCKHOFF, P. B. AND THOMSEN, P. D. Chromosome aberration in in vitro-produced bovine embryos at days 2–5 post-insemination. *Biol. Reprod.* 63: 1143–1148, 2000.

VOGE JL, SANTIAGO CAT, AAD PY, GOAD DW, MALAYER JR, SPICER LJ. Quantification of insulin-like growth factor binding protein mRNA using real-time PCR in bovine granulosa and theca cells: effect of oestradiol, insulin, and gonadotropins. *Domest. Anim. Endocrinol.* 26:241–58, 2004.

VONNAHME KA, HESS BW, HANSEN TR, MCCORMICK RJ, RULE DC. Maternal undernutrition from early- to mid-gestation leads to growth retardation, cardiac ventricular hypertrophy, and increased liver weight in the fetal sheep. *Biol. Reprod.* 69:133–140, 2003.

WALLACE JM, BOURKE DA, AITKEN RP, LEITCH N, HAY JR WW. Blood flows and nutrient uptakes in growthrestricted pregnancies induced by overnourishing adolescent sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282:1027–1036, 2002.

WALLACE JM, BOURKE DA, DA SILVA P, AITKEN RP. Nutrient partitioning during adolescent pregnancy. *Reproduction.* 122:347–357, 2001.

WALLACE JM, BOURKE DA, AITKEN RP, PALMER RM, DA SILVA P, CRUICKSHANK MA. Relationship between nutritionally-mediated placental growth restriction and fetal growth, body composition and endocrine status during late gestation in adolescent sheep. *Placenta.* 21:100–108, 2000.

WALLACE JM, BOURKE DA, AITKEN RP, CRUICKSHANK MA. Switching maternal dietary intake at the end of the first trimester has profound effects on placental development and fetal growth in adolescent ewes carrying singleton fetuses. *Biol. Reprod.* 61:101–110, 1999a.

WALLACE JM, BOURKE DA, AITKEN RP. Nutrition and fetal growth: paradoxical effects in the overnourished adolescent sheep. *J. Reprod. Fertil.* 54:385–399, 1999b.

WALLACE JM, AITKEN RP, CHEYNE MA. Nutrient partitioning and fetal growth in rapidly growing adolescent ewes. *J. Reprod. Fertil.* 107:183–190, 1996.

WATHES DC, TAYLOR VJ, CHENG Z, MANN GE. Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. *Reprod. Suppl.* 61: 219–237, 2003.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J. Anim. Sci.* 82:63–74, 2004.

WEHRMAN, M. E., K. E. FIKE, E. J. MELVIN, E. G. M. BERGFELD, J. E. KINDER. Development of a persistent ovarian follicle during synchronization of estrus does not alter conception rate after embryo transfer in cattle. *Theriogenology.* 45:291, 1996.

WHITLEY, N.C., MCFADIN-BUFF, E.L., KEISLER, D.H. Effect of insulin on feed intake and reproductive performance of Well-nourished nulliparous ewes. *Theriogenology.* 54: 1049-1054, 2000.

WILLIAMS SA, BLACHE D, MARTIN GB, SCARAMUZZI RJ. The effect of oral administration of a glucogenic mixture on ovulation rate and characterisation of GLUT1 and GLUT4 in sheep ovarian follicles. *J. Reprod. Fertil.* 122: 947–956, 2001.

WILLIAMS, S. Q.; YAAKUB, H.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M. P.; SCARAMUZZI, R.J. Effect of energy intake from diet or infusion of glucose on ovulation rate in ewes. *J.Reprod. Fertil.* 19:150, 1997.

WILSON, M.E. IGF-I administration advances the decrease in hypersensitivity to oestradiol negative feedback inhibition of serum LH in adolescent female rhesus monkeys. *J. Endocrinol.* 145: 121–130, 1995.

WOAD KJ, BAXTER G, HOGG CO, BRAMLEY TA, WEBB R, ARMSTRONG DG. Expression of mRNA encoding insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine corpus luteum at defined stages of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 120:293–302, 2000.

WRENZYCKI, C., DE SOUSA, P., OVERSTROM, E. W., DUBY, R. T., HERRMANN, D., WATSON, A. J., NIEMANN, H., O'CALLAGHAN, D. and BOLAND, M. P. Effects of superovulated heifer diet type and quantity on relative mRNA abundances and pyruvate metabolism in recovered embryos. *J. Reprod. Fertil.* 118: 69–78, 2000.

ZHOU J, ADESANYA OO, VATZIAS G, HAMMOND JM, BONDY CA. Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular selection. *Endocrinology.* 137: 4893–4901, 1996.

KENDALL NR, SCARAMUZZI RJ, BAIRD DT, WEBB R, CAMPBELL BK. Direct in vivo effects of leptin on ovarian steroidogenesis in sheep. *Reproduction.* 128: 757–765, 2004.

KENNY, D.A., BOLAND, M.P., DISKIN, M.G., SREENAN, J.M. Effect of pasture crude protein and fermentable energy supplementation on blood metabolite and progesterone concentration and embryo survival in heifers. *Anim. Sci.* 73:501–511, 2001.

KENNY, D.A., BOLAND, M.P., DISKIN, M.G., SREENAN, J.M. Effect of rumen degradable protein with or without fermentable carbohydrate supplementation on blood metabolites and embryo survival in cattle. *Anim. Sci.* 74:529–537, 2002.

KERBLER, T.L., BUHR, M.M., JORDAN, L.T., LESLIE, K.E., WALTON, J.S. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology.* 47:703–714, 1997.

KHAN, M.H; AGARWAL, S.K.; HOQUE, M. MAJUMDAR, A.C., SHANKAR, U. Effect of exogenous administration of insulin on follicular dynamics in goat. *Indian J. Anim. Sci.* 10:1140-1143, 2005.

KING, W. A., VERINI SUPPLIZI, A., DIOP, H. E. P., BOUSQUET, D. Chromosomal analysis of embryos produced by artificially inseminated superovulated cattle. *Genet.. Sel. Evol.* 27: 189–194, 1995.

KIRCHICK HJ, KEYES PL, FRYE BE. Restoration of the LH surge and ovulation by insulin in alloxan-diabetic immature rats treated with pregnant mare's serum gonadotrophin. *Acta Endocrinol.* 100: 266–273, 1982.

YAAKUB, H., O'CALLAGHAN, D., BOLAND, M. P. Effect of roughage type and concentrate supplementation on follicle numbers and in vitro fertilisation and development of oocytes recovered from beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 12: 1–12, 1999.

YAAKUB H, O'CALLAGHAN D, BOLAND MP. In vitro embryo development from oocytes recovered from follicles in cattle in different diets. In: Agric Res Forum, 23rd Annual Research Meeting of Irish Grassland and Animal Production Association. 267–268, 1997.

YASEEN MA, WRENZYCKI C, HERRMANN D, CARNWATH JW, NIEMANN H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGFIIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. *Reproduction.* 122:601–10, 2001.

YIN, X. J., KATO, Y. AND TSUNODA, Y. Effect of enucleation procedures and maturation conditions on the development of nuclear-transferred rabbit oocytes receiving male fibroblast cells. *Reproduction.* 124: 41–47, 2002.

YOSHIDA Y, MIYAMURA M, HAMANO S, YOSHIDA M. Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during in vitro maturation and after fertilization in vitro. *J. Vet. Méd. Sci.* 60: 549–54, 1998.

11 ANEXO

ANEXO 1



Painel 1. Registro das etapas do experimento: (A) Seleção das fêmeas, (B) Colocação das esponjas intravaginais, (C) Detecção do estro e cobertura, (D) Colheita de sangue.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)