



**UDESC**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO DO  $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO SOBRE A  
FUNÇÃO OVARIANA DE VACAS LEITEIRAS  
SUBMETIDAS A PROTOCOLO DE  
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO**

**ALEXANDRO FRITZEN**

**CHAPECÓ, 2017**

**ALEXANDRO FRITZEN**

**EFEITO DO  $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO SOBRE A FUNÇÃO  
OVARIANA DE VACAS LEITEIRAS SUBMETIDAS A  
PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**.

**Orientador: Rogério Ferreira**

Co-orientadores: Julcemar Dias Kessler e  
Diego de Cordova Cucco

Chapecó, SC, Brasil

2017

- 1 Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a),  
com auxílio do programa de geração automática  
da

Biblioteca Setorial do CEO/UDESC

Fritzen, Alexandro

EFEITO DO BETA-HIDROXIBUTIRATO SOBRE  
A FUNÇÃO OVARIANA DE VACAS LEITEIRAS  
SUBMETIDAS A PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO  
ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO / Alexandro

Fritzen. - Chapecó , 2017.

41 p.

Orientador: Rogério Ferreira

Co-orientador: Julcemar Dias Kessler

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado

de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do  
Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,  
Chapecó, 2017.

Universidade do Estado de Santa Catarina  
UDESC Oeste  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

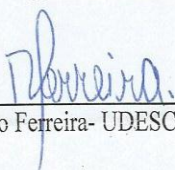
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

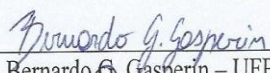
**EFEITO DOS NÍVEIS DE  $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO SOBRE A FUNÇÃO  
OVARIANA DE VACAS LEITEIRAS SUBMETIDAS A PROTOCOLO DE  
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO.**

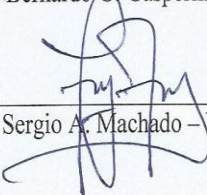
Elaborada por  
**Alexandro Fritzen**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Zootecnia**

Comissão Examinadora:

  
Dr. Rogério Ferreira- UDESC/Chapecó (Presidente)

  
Dr. Bernardo G. Gasperin – UFPel (Titular)

  
Dr. Sergio A. Machado – UNOESC (Titular)

Chapecó, 09 de março de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

Dedico esta conquista a minha esposa Leticia A. Turatti, que de maneira incansável sempre me apoiou na busca pelos meus sonhos, e que nos momentos difíceis foi meu alicerce, me dando suporte para continuar a caminhada. Agradeço também meus pais e irmãos, que sempre garantiram a construção de fundações morais e éticas robustas, as quais conduziram-me no caminho correto, e renderam grandes alegrias.

De maneira especial, quero agradecer ao Professor Dr. Rogério Ferreira, pela orientação, companheirismo e empenho em construir mais esta etapa de minha formação humana e acadêmica. Agradeço ainda a Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) pelos recursos e estrutura para o desenvolvimento da minha formação.

Agradeço a Patricia e ao Élio por proporcionar condições para o desenvolvimento desta minha caminhada. Aos colegas do Grupo de Estudos em Reprodução Animal (GERA), pelo apoio, e pelos momentos de discussões científicas, onde muito cresci como mestrando e como profissional. Quero ainda agradecer aos produtores, que de maneira inovadora disponibilizaram os seus rebanhos para que os experimentos fossem realizados.

## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina

### **EFEITO DO $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO SOBRE A FUNÇÃO OVARIANA DE VACAS LEITEIRAS SUBMETIDAS A PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO.**

AUTOR: ALEXANDRO FRITZEN  
ORIENTADOR(A): ROGÉRIO FERREIRA  
Chapecó, 09 de março de 2017

A seleção de animais com capacidade produtiva superior conduziu à alta produção, necessidades nutricionais únicas e problemas reprodutivos variados, comprometendo a eficiência dos rebanhos leiteiros modernos. No período das últimas três semanas até o pico de lactação, as alterações metabólicas conduzem à elevados níveis de ácidos graxos não esterificados e baixos de glicose, com comprometimento da responsividade e sensibilidade tecidual à insulina. O resultado é o desacoplamento do eixo somatotrópico, evidenciado pelos elevados níveis de hormônio do crescimento e queda de suas somatomedinas. Esta condição conduz à doenças metabólicas, anestro, formação de cistos, alterações do tempo de vida do corpo lúteo, níveis baixos de progesterona e estradiol que alteram a qualidade dos oócitos e do ambiente uterino. Uma abordagem comum é o uso de protocolos hormonais para contornar os problemas acima mencionados. No entanto, a utilização de protocolos hormonais no pós-parto geralmente resulta em baixa eficiência e grande variabilidade dos resultados. Para resolver esta questão avaliamos o efeito do  $\beta$ -hidroxibutirato sobre a função ovariana de vacas leiteiras, submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. Vinte vacas leiteiras receberam protocolo hormonal em média 81,95 dias após o parto, mensurando-se o  $\beta$ -hidroxibutirato com medidor de mão no início do protocolo e a progesterona plasmática no quinto dia pós inseminação. Um segundo experimento foi realizado com dezoito vacas leiteiras que receberam protocolo hormonal em média 73,94 dias após o parto, mensurando-se os níveis de  $\beta$ -hidroxibutirato no início do protocolo hormonal e avaliando o comportamento da onda folicular e a taxa de ovulação através de ultrassonografia. Os resultados demonstraram que o  $\beta$ -hidroxibutirato medido no início do protocolo de inseminação artificial em tempo fixo não consegue prever; o comportamento da onda folicular, a taxa de ovulação e não tem correlação com os níveis de progesterona do quinto dia pós inseminação.

**Palavras-chave:** Reprodução, Período de transição, Vacas leiteiras.

## **ABSTRACT**

Master's Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina

### **EFFECT OF $\beta$ -HYDROXYBUTIRATE ON THE OVARIAN FUNCTION OF DAIRY COWS SUBMITTED TO PROTOCOL OF TIMED ARTIFICIAL INSEMINATION.**

AUTHOR: ALEXANDRO FRITZEN

ADVISER: ROGÉRIO FERREIRA

Chapecó, 09 march 2017

The selection of animals with superior productive capacity led to high production, unique nutritional needs and varied reproductive problems, compromising the efficiency of modern dairy herds. In the period of the last three weeks until peak lactation, metabolic changes lead to high levels of non-esterified fatty acids and low glucose, impairing responsiveness and tissue sensitivity to insulin, resulting in the uncoupling of the somatotrophic axis, evidenced by the high levels of growth hormone and fall of their somatomedins. This condition leads to metabolic diseases, anestrus, cyst formation, changes in corpus luteum life span, low levels of progesterone and estradiol, changes in duration and intensity of estrus, and alter the quality of oocytes and the uterine environment. A common approach is to use hormonal protocols to circumvent the above-mentioned problems. However, the use of hormonal protocols on postpartum period usually determines low efficiency and high results variability. To solve this question, we evaluated the effect of  $\beta$ -hydroxybutyrate on the ovarian function of dairy cows submitted to fixed-time artificial insemination protocols. Twenty dairy cows received a hormonal protocol at a mean of 81.95 days postpartum, measuring  $\beta$ -hydroxybutyrate with a hand meter device at the beginning of the protocol and plasma progesterone on the fifth day after insemination. A second experiment was performed with eighteen dairy cows that received a hormonal protocol on average 73.94 days postpartum, measuring the levels of  $\beta$ -hydroxybutyrate at the beginning of the hormonal protocol and evaluating the behavior of the follicular wave and ovulation rate through of ultrasonography. The results showed that the  $\beta$ -hydroxybutyrate measured at the beginning of the protocol of insemination at fixed time could not predict; the follicular wave behavior, ovulation rate and has no correlation with progesterone levels of the fifth day post insemination.

**Keywords:** Reproduction, Transition period, Dairy cows.

## SUMÁRIO

1	CAPITULO I .....	9
	REVISÃO DE LITERATURA.....	9
	1.1-O PERÍODO DE TRANSIÇÃO.....	9
	1.2-REPRODUÇÃO EM VACAS LEITEIRAS .....	12
	1.2.1 Manipulação da onda folicular.....	15
	CAPÍTULO II.....	19
	2.1 – ARTIGO .....	20
	3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37



## 2 CAPITULO I

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.1-O PERÍODO DE TRANSIÇÃO

O período de transição compreende as três semanas que antecedem o parto e as três primeiras semanas pós-parto, sendo este marcado por intensas mudanças metabólicas, endócrinas, e imunológicas (DRACKLEY, 1999), as quais remetem a alta incidência de doenças, tornando o período de transição alvo de estratégias nutricionais que visam evitar enfermidades metabólicas e imunossupressão (BELL, 1995; LEBLANC, 2012). Esta fase também marca o reinício da atividade cíclica ovariana (BUTLER, 2003; ROCHE; MACKEY; DISKIN, 2000), o processo de involução uterina, eliminação da contaminação bacteriana e regeneração do epitélio uterino que tem seu início após o parto (SHELDON et al., 2006).

Nas últimas semanas de gestação, o crescimento fetal associado à síntese do colostro impõem demandas nutricionais elevadas (BELL, 1995), já que o consumo de matéria seca neste momento começa a declinar: cai 25% em novilhas e 52% em vacas nos últimos 14 dias que antecedem o parto (GRUMMER; MASHEK; HAYIRLI, 2004; KIMURA; REINHARDT; GOFF, 2006). A redução no consumo de matéria seca induz a mobilização de reservas corporais antes do parto, fato que pode ser constatado pelo aumento dos níveis de ácidos graxos não esterificados (NEFAs) e  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) (BELL, 1995). Desta forma, NEFAs e BHB constituem indicadores da redução no consumo de matéria seca (OVERTON; WALDRON, 2004) e caracterizam o Balanço Energético Negativo (BEN), período que as demandas de energia são maiores que o aporte nutricional e levam a mobilização de reservas corporais (DRACKLEY; CARDOSO, 2014).

Com o BEN, os níveis de NEFAs se elevam de maneira dependente à intensidade da deficiência energética (BELL, 1995), causando efeitos no sistema imunológico e predispondo a doenças metabólicas. Níveis elevados de NEFAs induzem acúmulo de lipídios nos hepatócitos, que juntamente com a baixa disponibilidade de glicose e consequente redução do oxaloacetato impedem a oxidação completa das moléculas de acetil-CoA oriundas da  $\beta$ -oxidação (BELL, 1995). O aumento de acetil-CoA, que é

convertido em corpos cetônicos (acetoacetato,  $\beta$ -hidroxibutirato, e acetona) ou pode ser substrato para a síntese de acetato (MULLIGAN; DOHERTY, 2008), facilita a ocorrência de lipidose hepática e cetose.

No período de transição ocorrem mudanças hormonais relacionadas ao parto e à adaptação do metabolismo para o início da lactação (DRACKLEY et al., 2005). Nas últimas três semanas que antecedem o parto, observa-se queda dos níveis de insulina, e em contra partida o aumento dos níveis de hormônio do crescimento (GH) (RHOADS et al., 2004). Esta redução na insulina e aumento do GH são um claro estímulo lipolítico, que é acompanhado pela redução dos níveis do Fator de Crescimento Semelhante a Insulina- 1 (IGF-1), demonstrando o desacoplamento do eixo somatotrópico (CHILLIARD et al., 2009). Estudos com infusão de insulina e glicose (Hiperinsulinêmicos-euglicêmicos) em vacas leiteiras demonstraram a reversão do desacoplamento do eixo GH-IGF-1, observando-se que a insulina aumentou a expressão de receptores de GH e com isso, houve elevação dos níveis plasmáticos de IGF-1 (FENWICK et al., 2008; RHOADS et al., 2004).

Além da queda dos níveis de insulina, a sua sensibilidade também é afetada pelas adaptações hormonais homeorréticas, fenômeno este conhecido como resistência à insulina (DE KOSTER; OPSOMER, 2013; PIRES; SOUZA; GRUMMER, 2007). Com a redução da sensibilidade e da responsividade à insulina, ocorre o aumento da mobilização de reservas corporais, que são priorizadas para glândula mamária, pois este órgão não é dependente deste hormônio para o aporte celular de glicose (DE KOSTER; OPSOMER, 2013). Estudos com infusão de gordura (NEFAs) demonstraram que hiperlipidemia pode interferir com a responsividade e sensibilidade dos tecidos à insulina (PIRES; SOUZA; GRUMMER, 2007), pois o acúmulo de acetil-CoA e diacilglicerol interferem com a sinalização intracelular desse hormônio (LEWIS et al., 2002).

Com a aproximação da maturidade do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal do feto, ocorre a liberação de glicocorticoides e observa-se queda nos níveis séricos de progesterona e aumento dos níveis de estradiol, revertendo a quiescência uterina e iniciando as contrações que conduzirão ao nascimento do concepto (SINGER, 2007). Após o parto, a galactopoiese aumenta o BEN e com isso a mobilização de reservas se acentua, elevando os NEFAs (DRACKLEY et al., 2005).

A mobilização de gordura e sua metabolização têm efeitos sobre o sistema imunológico e sobre suas citocinas (CONTRERAS et al., 2012; SORDILLO; RAPHAEL,

2013). Estudos *in vitro* com o uso de hepatócitos bovinos, demonstraram que a exposição dessas células aos NEFAs ativa o NF- $\kappa$ B (Fator Nuclear Kappa B), um fator de transcrição envolvido com a expressão de genes do TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral Alfa), IL-6 (Interleucina seis) e IL-1 $\beta$  (Interleucina um beta), conduzindo a inflamação das células hepáticas (SHI et al., 2015). Esta via também pode ser ativada por BHB (SHI et al., 2014). Além da sinalização intracelular, os NEFAs induzem a lipotoxicidade através da produção de ceramidas e palmitoilação de moléculas, alterando suas funções biológicas e aumentando a produção de radicais livres (CONTRERAS; SORDILLO, 2011).

O estado “inflamatório” do período de transição, induzido pela mobilização de gordura com perfil saturado (ácido palmítico, esteárico e oleico) e a redução das gorduras poli-insaturadas (ômega 3), compromete a resposta imunológica celular e humoral (CONTRERAS et al., 2012; CONTRERAS; SORDILLO, 2011). Portanto, predispõem ao aparecimento de doenças infecciosas como mastite e metrite. Outro efeito é a interferência de citocinas pro-inflamatórias com a sensibilidade dos tecidos à insulina e a redução do consumo de matéria seca (LEBLANC, 2012).

O monitoramento do status metabólico pode ser realizado através da mensuração de NEFAs e de BHB, que demonstram a intensidade da mobilização de reservas corporais e o grau de oxidação dos ácidos graxos mobilizados, respectivamente (BELL, 1995; LEBLANC, 2010; OVERTON; WALDRON, 2004). Portanto, esta mensuração é utilizada como ferramenta para a interpretação da intensidade do BEN e da ocorrência de doenças (Cetose). Os níveis plasmáticos de NEFAs no final da lactação e no período seco estão abaixo de 0,2mM/L, porém duas semanas antes do parto estes níveis se elevam. Há um pico entre o parto e dez dias pós-parto, com níveis plasmáticos de 0,75mM/L ou mais, dependendo da mobilização (CONTRERAS; SORDILLO, 2011). Vacas que desenvolvem cetose apresentam níveis de NEFAs acima de 1,0mM/L (GONZÁLEZ et al., 2011).

Estudos usando o medidor de mão Optium Xceed<sup>®</sup> comparados ao teste laboratorial (Merck Microlab 200, Darmstadt, Germany), comprovaram excelente correlação ( $r = 97\%$ ). Para valores iguais ou acima de 1,2mmol/L a sensibilidade e a especificidade foram de 85 e 94% respectivamente (VOYVODA; ERDOGAN, 2010). Para concentrações iguais ou acima de 1,4mmol/L observou-se 90% de sensibilidade e 98% de especificidade (VOYVODA; ERDOGAN, 2010). No caso da glicose, os resultados apontam grande variabilidade entre o laboratório e o glicosímetro,

necessitando de maiores configurações para uso em bovinos (VOYVODA; ERDOGAN, 2010).

Os níveis séricos de BHB no pós-parto de vacas leiteiras variaram em resposta à mobilização de reservas corporais (DRACKLEY et al., 2005). Em vacas com alta mobilização os níveis foram de 1,45mmol/L: já em vacas com baixa mobilização, as concentrações de BHB foram de 1,0mmol/L. Os níveis de glicose também diferiram, estando em 3,37mmol/L (60,72 mg/dL) no grupo de alta mobilização e ficando em 3,82mmol/L (68,82 mg/dL) com baixa mobilização (GONZÁLEZ et al., 2011). São considerados casos de cetose subclínica níveis de BHB entre 1,2 a 1,4mmol/L, abaixo de 1,0mmol/L há ausência de doença e acima de 1,5mmol/L ocorre cetose clínica (LEBLANC, 2010).

A maior incidência de cetose subclínica se concentra nas primeiras três semanas pós parto e está associada à lipidose hepática, porém, em um estudos em 25 fazendas no Canadá, a incidência acumulada na nona semana de lactação foi de 43% de cetose subclínica (LEBLANC, 2010). A ocorrência de cetose relacionada a baixos níveis de glicose não está restrita somente às duas primeiras semanas pós parto, sendo também indicado o monitoramento durante as primeiras sete semanas (LEBLANC, 2010; OETZEL, 2004).

## 1.2-REPRODUÇÃO EM VACAS LEITEIRAS

O processo de seleção genética dos bovinos leiteiros teve uma intensa pressão sobre as características leiteiras e trouxe como consequência animais de alta capacidade produtiva, mas com demandas nutricionais especiais e grandes desafios reprodutivos (BUTLER, 2003; BUTLER; SMITH, 1989; WATHES et al., 2007). Após o parto, as demandas nutricionais são elevadas e defrontam com a baixa ingestão de matéria seca, que ocorre entre o parto e o pico de lactação, momento crítico para a reprodução pois corresponde ao período do acasalamento em rebanhos que visam índices zootécnicos adequados (BELL, 1995; DRACKLEY et al., 2005; KAWASHIMA et al., 2012; ROCHE; MACKEY; DISKIN, 2000).

Após o parto os níveis de estradiol estão em declínio e o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal deve recuperar-se dos efeitos da gestação, induzir o desenvolvimento

folicular, e manifestar cio com ovulação e formação de um corpo lúteo funcional (BUTLER, 2003; BUTLER; SMITH, 1989; KAWASHIMA et al., 2012). Cinco a sete dias após o parto, há o aumento dos níveis séricos de FSH (Hormônio Folículo Estimulante), resultando em uma onda folicular (WILT BANK et al., 2006) que pode levar a três situações: (1) crescimento folicular e subsequente ovulação, (2) atresia folicular com reinício de uma nova onda, ou a (3) formação de cisto ovariano (BUTLER, 2003). O aumento sérico de FSH no pós-parto é insensível ao balanço energético, porém a subsequente liberação de LH (Hormônio Luteinizante) não tem o mesmo comportamento (BUTLER, 2003; KAWASHIMA et al., 2012).

A capacidade de manter um padrão (amplitude e frequência) adequado de liberação de LH, determina o destino do folículo após o início do seu crescimento e desenvolvimento na dependência a esta gonadotrofina. Este mesmo folículo pode ser ovulado quando há liberação de um pico de LH, ou entrar em atresia na ausência deste padrão (GINTHER et al., 2003b; SARTORI et al., 2001). Estudos com infusão intraventricular de insulina em modelos experimentais ovinos, demonstraram que a liberação de LH é sensível à insulina e aos níveis de glicose (TANAKA et al., 2000, 2002). O mesmo foi constatado em bovinos com balanço energético negativo, o que explica, em partes, a variabilidade no momento da primeira ovulação pós-parto (BUTLER, 2003; BUTLER; SMITH, 1989; KAWASHIMA et al., 2012).

A esteroidogênese do folículo reflete sua capacidade de desenvolvimento e está ligada com o estabelecimento da dominância folicular (GINTHER et al., 2003b). Com o aumento da produção de estradiol e inibina, ocorre o decréscimo dos níveis de FSH, o que culmina com seleção do folículo dominante (GINTHER et al., 2003b). Para manter a esteroidogênese, o folículo dominante conta com mecanismos celulares que aumentam os níveis de IGF-1 livre e induzem a expressão de receptores de LH pelas células da granulosa. Com isso, há aumento do estradiol, que em níveis adequados e na ausência de progesterona, induzem ao pico pré-ovulatório de LH (KARSCH, 1987).

No pós-parto os níveis de IGF-1 circulantes são baixos, devido ao BEN e suas consequências metabólicas (figura 02), situação essa correlacionada a redução da fertilidade (BUTLER; PELTON; BUTLER, 2004; BUTLER, 2003; KAWASHIMA et al., 2012; WATHES et al., 2007). No folículo o IGF-1 é produzido em resposta ao estímulo do LH, e conseqüentemente ocorre a redução dos níveis de IGFBP-2 (Proteína Ligadora do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina- Dois). Isso acontece, devido à ação de enzimas que degradam esta proteína, deixando o IGF-1 na forma livre, o que potencializa

a esteroidogênese (GINTHER et al., 1996, 2003a). Há divergências na opinião sobre o efeito parácrino-autócrino ou endócrino do IGF-1, porém estudo demonstra ação endócrina no caso dos ruminantes, sendo o efeito parácrino mais evidente no útero e oviduto nesta espécie (VELAZQUEZ; SPICER; WATHES, 2008).

Outro hormônio que potencializa a ação das gonadotropinas é a insulina, aumentando a esteroidogênese. Estudos com infusão de insulina demonstraram aumento dos níveis de estradiol e IGF-1 sem alterações dos padrões de LH, sugerindo efeito local em folículos da primeira onda folicular pós-parto (BUTLER; PELTON; BUTLER, 2004). O aumento da esteroidogênese induzido por este hormônio também foi comprovado *in vitro* em culturas de células da granulosa (BHATIA; PRICE, 2001). Por sua vez, o estradiol é um forte estímulo para a liberação de LH, porém a presença de progesterona atua bloqueando esta ação no hipotálamo (RICHTER et al., 2005).

Os níveis de estradiol são fundamentais para a redução da produção de FSH, e estabelecimento da dominância folicular, influenciando o pico pré ovulatório de LH e a manifestação de cio (BODENSTEINER et al., 1996; GINTHER et al., 2003b). Em vacas leiteiras, o aumento do fluxo sanguíneo hepático induz elevada metabolização dos esteroides, comprometendo os níveis de estradiol (WILTBANK et al., 2000). Isso ocorre juntamente com as alterações endócrinas (redução de insulina, IGF-1 e glicose) que produzem aumento das ovulações duplas e diminuição do tempo de cio (WILTBANK et al., 2006).

Após o pico pré-ovulatório de LH e subsequente ovulação, a membrana basal que separava células da teca e da granulosa se rompe, formando uma estrutura que tem a função de produzir progesterona, denominada de corpo lúteo. Esta glândula de caráter transitório tem seu tempo de vida controlado pela liberação de prostaglandina F dois alfa ( $PGF_{2\alpha}$ ), que é produzida no endométrio (NISWENDER et al., 2000). O desenvolvimento do concepto é dependente de um ambiente progesterônico, que garante a secreção das glândulas endometriais, favorecendo a elongação e produção adequada de interferon tau ( $IFN-\tau$ ) pelas células trofoblásticas (CLEMENTE et al., 2009; LONERGAN, 2011; SATTERFIELD, 2006). Com níveis adequados de  $IFN-\tau$  ocorre a supressão da transcrição dos receptores  $\alpha$  de estradiol ( $ER\alpha$ ) e dos genes do receptor de ocitocina, bloqueando o mecanismo luteolítico (SPENCER et al., 2004).

A formação de um corpo lúteo funcional é dependente da secreção de LH e da saúde do folículo do qual ele provém. Em condições de BEN, os níveis de NEFAs se elevam causando prejuízos a esteroidogênese do folículo, conduzindo a formação de um

corpo lúteo pequeno e com baixa produção de progesterona (LEROY et al., 2008; VAN HOECK et al., 2014). Com estas alterações causadas pelo BEN, também é observado um aumento da incidência de “corpo lúteo persistente”, porém a sua etiologia e os parâmetros para sua classificação ainda são vagos (STRÜVE et al., 2013). Estas alterações na produção de progesterona, somadas ao seu alto metabolismo, propiciam a queda dos níveis plasmáticos. É visto então um efeito deletério sobre a produção histotrófica das glândulas endometriais, e conseqüentemente o comprometimento da elongação e produção de IFN- $\tau$  (LEROY et al., 2008); podendo contribuir para os altos índices de morte embrionária (20 a 45%) observados nas vacas leiteiras (WALSH; WILLIAMS; EVANS, 2011).

Como relatado anteriormente, o BEN compromete a reprodução em diversos pontos, levando a problemas como ondas foliculares anovulatórias, aumento da ocorrência de cio silencioso, diminuição da porcentagem de animais que aceitam monta (de 80% para 50%), e redução do tempo de cio, que passou de 15 para 5 horas (BUTLER, 2003; EVANS; WALSH, 2012; WALSH; WILLIAMS; EVANS, 2011). Além das alterações endócrinas e comportamentais, podem ocorrer prejuízos ao oócito que se desenvolve em ambiente com BEN, pois nestas condições o fluido folicular apresenta alterações em sua composição (LEROY et al., 2004a, 2004b, 2005).

Estudos com pirosequenciamento do *imprinting* materno de oócitos de vacas em BEN, ou maturados em meios com NEFAs, demonstraram que a aquisição do *imprinting* de genes maternos é influenciada pelo status metabólico, e que oócitos maturados com NEFAs perdem a metilação destes *imprint* (O'DOHERTY et al., 2014). Estas alterações epigenéticas interferem com a capacidade oocitária de manter o desenvolvimento do conceito, e desta forma demonstram prejuízos impostos pelo BEN à maturação dos oócitos (LEROY et al., 2008).

### 1.2.1 Manipulação da onda folicular

O crescimento folicular nos bovinos tem o padrão de ondas, com um tempo de 7 a 10 dias, onde passam por vários estágios de desenvolvimento, sendo eles: emergência, seleção, dominância e atresia ou ovulação (GINTHER et al., 2003b; SARTORI et al., 2001). A emergência de uma nova onda folicular é dependente do aumento dos níveis de FSH, que induz ao crescimento de um grupo de folículos. Os folículos por sua vez, durante este período produzem estradiol e inibina. Estes hormônios reduzem os níveis de

FSH e induzem ao processo de seleção folicular que produzirá mudanças no padrão de crescimento entre os folículos (GINTHER et al., 1996; SARTORI et al., 2001).

Com a redução dos níveis de FSH, o folículo precisa mater seu crescimento e sua esteroidogênese, para tal, ocorre a expressão de receptores de LH na granulosa 8 horas antes da sua dominância (BAO et al., 1997; BO et al., 1993, 1995). Outra característica é o aumento do IGF-1 livre no folículo dominante, que estimula a produção de estradiol, e garante seu crescimento em baixos níveis de FSH e na dependência de LH, estabelecendo assim a dominância sobre os demais folículos, que nestas condições começam o processo de atresia (WILTBANK et al., 2000). O crescimento final e a ovulação são dependentes da liberação de LH com amplitude e frequência adequadas, porém na presença de progesterona há o bloqueio desta gonadotrofina. O LH só será liberado após a luteólise e na presença de estradiol em níveis adequados produzidos pelo folículo dominante e caso isto não ocorra, o folículo dominante também entrará em atresia (FAIR, 2003; MIHM et al., 2002; WILTBANK et al., 2011).

O aumento dos problemas reprodutivos nos rebanhos leiteiros de alta produtividade impõe a busca por soluções que melhorem as taxas de prenhez e diminuam o intervalo entre partos. Dentre elas, a seleção genética com resultados à longo prazo e a intervenção hormonal que visa sanar o problema à curto prazo (LUCY; MCDOUGALL; NATION, 2004). As características de um bom protocolo hormonal são: altas taxas de manifestação de estro, ovulação dentro de um intervalo de 12 a 24 horas, taxas de concepção satisfatórias e facilidade de execução com custo acessível (DISKIN; AUSTIN; ROCHE, 2002).

Com a compreensão da onda folicular e dos fatores que a controlam, a manipulação foi um passo subsequente, com a administração de hormônios exógenos que intervêm nos eventos endócrinos e dão condições para tratar suas alterações (anestro, cistos e corpo lúteo persistente), ou mesmo sincronizar e induzir a ovulação de um lote de animais (LUCY; MCDOUGALL; NATION, 2004). Nas vacas leiteiras, a mudança do comportamento estral e a incapacidade de manter boas taxas de ovulação, conduzem ao uso de protocolos hormonais que diminuem a observação de cio e possibilitam a inseminação em tempo fixo (IATF) (DISKIN; AUSTIN; ROCHE, 2002).

O controle da emergência de uma nova onda folicular pode ser realizado pela administração de progesterona, que produz um feedback negativo sobre a liberação de LH levando à atrasia do folículo dominante (DISKIN; AUSTIN; ROCHE, 2002). Uma outra abordagem consiste na simples aplicação de uma dose de Hormônio Liberador de



Gonadotropinas (GnRH) de 100 µg que induz a liberação de LH da hipófise, causando a ovulação ou luteinização do folículo dominante, e a emergência de uma nova onda folicular (LUCY; MCDOUGALL; NATION, 2004). Os protocolos com progesterona são acompanhados da aplicação de estradiol no primeiro dia buscando induzir atresia de folículos subordinados, garantindo a emergência de uma nova onda com maior sincronia dos animais tratados (BO et al., 1994; SIQUEIRA et al., 2009).

Nos protocolos com suplementação de progestágenos, o tempo de permanência do dispositivo de liberação intravaginal de progesterona (pessário vaginal) é variável. O tempo de permanência do pessário vaginal é de 7 a 9 dias, sendo este fundamental para o crescimento adequado do folículo dominante, pois a exposição prematura ao pico de LH causa prejuízos na fertilidade e períodos prologados de persistência do folículo dominante induzem a degeneração do oócito comprometendo as taxas de concepção (LUCY; MCDOUGALL; NATION, 2004).

O controle do tempo de vida do corpo lúteo através de estrógenos ou de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  também se configura como ferramenta para sincronização do estro, porém com ampla variação do momento de ovulação e com necessidade de ciclicidade (DISKIN; AUSTIN; ROCHE, 2002). Nos protocolos com suplementação de progesterona, a retirada do pessário vaginal induz a redução dos níveis séricos de progesterona, porém na presença de um corpo lúteo esta queda não ocorre, comprometendo o sucesso do protocolo. Nestes casos a aplicação de uma dose de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  induz a luteólise garantindo redução dos níveis de progesterona e aumento da liberação de LH (DISKIN; AUSTIN; ROCHE, 2002; LUCY; MCDOUGALL; NATION, 2004; WILTBANK et al., 2011).

A variabilidade do momento da ovulação pode ser resolvida com o uso de indutores de ovulação, como o GnRH ou o estradiol. Esta configuração de protocolo traz a possibilidade de realizar a inseminação em tempo fixo, não necessitando da observação de cio, porém o seu uso deve ser associado aos protocolos de sincronização e indução (WILTBANK et al., 2011). O uso de 1 mg de cipionato de estradiol ou de valerato de estradiol 24 horas após a retirada do progestágeno está associado a redução nas taxas de prenhez em novilhas, porém em vacas em anestro esta dose é benéfica (DISKIN; AUSTIN; ROCHE, 2002).

Em protocolos de IATF, os índices de prenhez aceitáveis estão entre 50 e 60%, com uma única inseminação (DISKIN; AUSTIN; ROCHE, 2002). Os resultados em rebanhos leiteiros variam de 30 a 39%, e em vacas não cíclicas estes índices caem para 19%. Vacas que não concebem na primeira inseminação apresentam redução de 46% para

33% na resincronização, o que é baixo em comparação aos protocolos em bovinos de corte (PFEIFER et al., 2015; THATCHER et al., 2006).

### **3 CAPÍTULO II**

#### **MANUSCRITO**

Os resultados desta dissertação serão apresentados na forma de um manuscrito, com formatação de acordo com as normas da revista a qual será submetido.

## 2.1 – ARTIGO

**Effect of  $\beta$ -hydroxybutyrate levels on the ovarian function of dairy cows submitted to a protocol of timed artificial insemination.**

Alexandro Fritzen, Raquel G. Perreira, Clerio A. Hoefle, Rogério Ferreira

De acordo com normas para publicação em:

Reproduction in Domestic Animals

1 **Effect of  $\beta$ -hydroxybutyrate levels on the ovarian function of dairy cows submitted**  
2 **to a protocol of timed artificial insemination.**

3  
4 **Alexandro Fritzen<sup>1</sup>, Raquel Grande Pereira<sup>1</sup>, Clério Antônio Hoefle<sup>1</sup>, Rogério**  
5 **Ferreira<sup>1\*</sup>**

6  
7 **ABSTRACT**

8 In the transition period, metabolic changes occur that support milk production in a  
9 Negative Energy Balance (NEB) environment. These changes result in elevations in  
10 plasma levels of growth hormone (GH), non-esterified fatty acids (NEFAs),  $\beta$ -  
11 hydroxybutyrate (BHB) and decreased levels of glucose, insulin and IGF-1 (Insulin-like  
12 Growth Factor-1 ) compromising reproduction. The use of fixed-time artificial  
13 insemination protocols (TAI) is a common practice in dairy farming, but the effect of  
14 metabolism from the moment of submission of the animals to the hormonal protocol in  
15 relation to ovarian function is unclear. The objective of the experiment was to evaluate  
16 the effect of BHB levels from the moment of submission to the TAI protocol on the  
17 ovarian function of dairy cows. Thirty-eight cows where submitted to hormonal protocols  
18 and divided in two experiments, evaluating the effect of BHB levels at the beginning of  
19 the protocol on the progesterone levels of the fifth day after insemination and on the  
20 follicular dynamics and ovulation rate accompanied by ultrasonography. The results  
21 showed that the  $\beta$ -hydroxybutyrate measured at the beginning of the protocol of artificial  
22 insemination at fixed time does not present correlation with, follicular growth, ovulation  
23 rate, and progesterone levels on the fifth day post insemination. In conclusion, the BHB  
24 levels do not affect the luteal function nor follicular development in dairy cow submitted  
25 to TAI protocol.

---

<sup>1</sup>Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil.

<sup>1\*</sup> Author for correspondence. E-mail: [rogerio.ferreira@udesc.br](mailto:rogerio.ferreira@udesc.br).

1 **Key words:** anestrus,  $\beta$ -hydroxybutyrate, NEFAs, transition period, insulin, IGF-1.

2

### 3 **INTRODUCTION**

4 In modern dairy herds, high production has become a reality in recent years  
5 (Butler, 2003; Drackley et al., 2005), but the reproductive indexes had great setbacks,  
6 becoming one of the biggest challenges of the current dairy cattle ranch (Butler and  
7 Smith, 1989; Lopes et al., 2007; Walsh et al., 2011). High nutritional demands associated  
8 with the reduction of dry matter consumption expose dairy cows to the mobilization of  
9 body reserves to meet the energy needs of production, a so-called negative energy balance  
10 (NEB) (Bell, 1995; Butler and Smith, 1989; Drackley, 1999).

11 At the end of gestation, there is a reduction in responsiveness and tissue sensitivity  
12 to insulin, which predisposes to lipolysis and an additional increase in NEFAs levels with  
13 impairment of hepatic gluconeogenesis, favoring ketogenesis and subsequent plasma  
14 elevation of  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) and acetoacetate (Pires et al., 2007; Rhoads et al.,  
15 2004). Insulin resistance reduces the expression of growth hormone receptors in the liver,  
16 decreasing the production of IGF-1 (Insulin-like Growth Factor) (Rhoads et al., 2004).  
17 Adequate levels of IGF-1, insulin and glucose are critical to the release of LH  
18 (Luteinizing Hormone) and steroidogenesis (Butler et al., 2004; Tanaka et al., 2000,  
19 2002).

20 Metabolic status monitoring can be performed through the serum levels of NEFAs  
21 and BHB, which demonstrate the intensity of mobilization of body reserves in response to  
22 NEB and the degree of oxidation of mobilized lipids, respectively (Bell, 1995; LeBlanc,  
23 2010; Overton and Waldron, 2004). With the advent of hand meter device for BHB,  
24 access to the metabolic condition can be performed instantly, showing high correlation  
25 with the laboratory methods (Voyvoda and Erdogan, 2010). The occurrence of ketosis is

1 related to high levels of NEFAs and hypoglycemia, with BHB equal to or below 0.6  
2 mmol/L after the peak of lactation considered normal and above 1.2 mmol/L subclinical  
3 ketosis (Kerestes et al., 2009; Oetzel, 2004).

4 Reduction of the fertility of dairy herds is a result of NEB and its metabolic and  
5 endocrine changes in the transition period (three weeks before and three weeks  
6 postpartum), leading to anestrous, silent estrus, cyst formation, and embryonic mortality  
7 (Butler, 2003; Butler and Smith, 1989; Kawashima et al., 2012). Under these conditions,  
8 intervention with hormonal protocols is frequent, aiming to reduce the impacts of NEB on  
9 reproduction. However the results of these timed artificial insemination protocols (TAI)  
10 are low with pregnancy rates ranging from 25.9 to 38.9% (Diskin et al., 2002; Thatcher et  
11 al., 2006).

12 BHB levels reflect the metabolic condition (Drackley, 1999; LeBlanc, 2010), and  
13 thus may influence the ovarian function of dairy cows in TAI protocols, helping to  
14 elucidate the variability of reproductive results. The objective of this study was to  
15 evaluate the effect of BHB levels at the beginning of the TAI protocol on the ovarian  
16 function of dairy cows.

17

## 18 **MATERIAL AND METHODS**

19

20 For the experiments, they were used Holstein cows, farms arranged in the western  
21 state of Santa Catarina, Brazil, receiving foods based on corn silage, concentrates,  
22 pastures composed of *Cynodon* spp. grasses family and free access to water. During the  
23 procedures the health conditions were observed, being included in the study only animals  
24 free of clinical alterations.

1           In experiment 01, twenty multiparous cows were used, with an average milk  
2 production of 20 liters per day, and days in milk (DIM) of 82. All animals were submitted  
3 to gynecological examination to evaluate the presence of clinical reproductive alterations,  
4 and blood samples were collected from the coccygeal vein to measure BHB with a hand  
5 meter device (TD-4235®; KetoVet, MG, Brazil) beginning of the hormonal protocol.  
6 After this step the cows received an intravaginal progesterone release device (pessary;  
7 Proclinar®, Hertape Calier, MG, Brazil) and a dose of 3mg of estradiol benzoate  
8 (Benzoate HC®, Herpate Calier, MG, Brazil), intramuscular IM). Nine days later the  
9 vaginal pessary was removed and the animals received a dose of PGF2 $\alpha$  analogue  
10 (Clorprostenol, 500 $\mu$ g, IM: Schering-Plow Animal Health, Brazil). Two days after  
11 pessary withdrawal the cows received a dose of GnRH (IM; Gonadorelin, 100 $\mu$ g: Fabiani  
12 Animal Health, Brazil). Sixteen hours after the GnRH dose the cows were inseminated  
13 and five days after the insemination, blood samples were collected from the coccygeal  
14 vein to measure progesterone.

15           All blood samples were collected in EDTA tubes and plasma was collected and  
16 stored in a freezer at -18°C. The progesterone measurements were performed through  
17 commercial immunoenzymatic tests as described by Colazo et al. (2008).

18           In the experiment 02, eighteen multiparous dairy cows were used, with average  
19 DIM of 74 days, mean milk yield of 27.14 liters. On the first day for protocol of TAI,  
20 these cows were submitted to gynecological examination, evaluation of BHB levels with  
21 hand meter device and receiving a vaginal pessary with progesterone followed by a dose  
22 of 3mg of estradiol benzoate (IM, Benzoate HC®, Herpate Calier, MG, Brazil), and a  
23 dose of 100 $\mu$ g of GnRH (IM; Gonadorelin, 100 $\mu$ g: Fabiani Animal Health, Brazil). On  
24 the fifth day of the protocol, the follicular wave was monitored by transrectal  
25 ultrasonography using a 7.5 MHz linear probe (DP10vet, Mindray, Bio-medical



1 Electronics, China). On the ninth day, the vaginal pessary was removed by applying a  
2 dose of 1mg of estradiol benzoate (IM) and analog of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (IM; Clorprostenol, 250  $\mu$ g:  
3 Schering-Plough Animal Health, Brazil). On the thirteenth day, all cows were evaluated  
4 with transrectal ultrasonography to determine the rate of ovulation through the presence  
5 of corpus luteum.

6 The effect of different BHB levels on progesterone concentration on the fifth day  
7 post insemination were evaluated by regression analysis. To evaluate the effect of plasma  
8 BHB levels on follicular growth, the animals were allocated into two classes (BHB  $\leq$ 0.7  
9 and BHB > 0.7). Follicular growth was compared between the two BHB classes using  
10 PROC MIXED (mixed models, SAS Institut Inc., Cary, NC) in a model for repeated data.  
11 The main effects, BHB concentration and the momentum (days) were determined; As  
12 well as their interactions. The effects of treatments on the dependent variables at a  
13 specific time point were determined by Student's t test using corrected means (LSmeans).  
14 The different covariance structures were tested for each model and the composite  
15 symmetry was used, since it presented the lowest Akaike information criterion (AIC). The  
16 effect of BHB concentrations on ovulation rate was tested by logistic regression. All  
17 continuous variables, as well as residuals from each model were tested for normality  
18 using the Shapiro-Wilk test and normalized, when necessary, according to each  
19 distribution. All analyzes were performed with the statistical package SAS and was  
20 adopted as level of significance P <0.05.

21

## 22 **RESULTS**

23 There was no influence (P <0.5) of BHB levels at the beginning of the hormonal  
24 protocol with serum progesterone values on the fifth day after insemination (Figure 01),

1 but there was a correlation ( $P < 0.004$ ) between the milk production and levels of BHB  
2 (Figure 02).

3 In experiment 02, no correlation was observed between BHB levels at the  
4 beginning of the hormonal protocol with follicular growth (Figure 03). When separated  
5 by groups (below 0.7 mmol/L and above 0.7 mmol/L) the follicular growth rate did not  
6 differ, and there was no correlation between BHB and follicular size on the days  
7 evaluated (Figure 03). The ovulation rate was 100%.

8

## 9 **DISCUSSION**

10 During the development of the follicles, several conditions may compromise the  
11 competence of the oocyte and the quality of the respective embryo, including the  
12 follicular environment (Moussa et al., 2015). This in turn is influenced by NEB, due to  
13 the increased levels of NEFAs and BHB in follicular fluid (Leroy et al., 2005; Leroy,  
14 Vanholder, Delanghe, Opsomer, Van Soom, Bols, and de Kruif, 2004; Leroy, Vanholder,  
15 Delanghe, Opsomer, Van Soom, Bols, Dewulf, et al., 2004) reduced levels of IGF-1,  
16 insulin and LH release (Butler, 2003).

17 In the present study, the effect of serum BHB levels at the beginning of the TAI  
18 protocol (mean 77.9 days postpartum) was evaluated, with no interference of BHB on  
19 follicular growth, and with equal growth rates between the different Levels of BHB  
20 (Figure 03). Transition period BHB, NEFAs, glucose and IGF-1 levels are correlated with  
21 reproductive performance of dairy cows (Butler, 2003; Butler et al., 2004; Garverick et  
22 al., 2013), however when BHB was evaluated outside the transition period no interference  
23 was observed with ovarian function (Figure 01 and 03).

24 During follicular growth, the production of estradiol and the expression of LH  
25 receptors are fundamental for subsequent ovulation (Sartori et al., 2001), being the

1 maximum responsiveness to LH reached above 13 mm (Bodensteiner et al., 1996; Sartori  
2 et al., 2001). It was observed that all the animals of the hormonal protocol of the  
3 experiment 02 presented ovulation after the application of estradiol benzoate,  
4 demonstrating adequate growth of the follicle and the integrity of the hypothalamic-  
5 pituitary-ovarian axis, despite the presence of varying levels of BHB. The release of LH  
6 is influenced by glucose levels and insulin (Tanaka et al., 2000, 2002), which are low in  
7 the transition period (Rhoads et al., 2004), and thus it is inferred that there was no  
8 interference of BHB levels on these conditions, which is demonstrated by the rate of  
9 ovulation.

10 The levels of progesterone are fundamental for the adequate growth of the  
11 concept, production of interferon- $\tau$  and recognition of pregnancy (Clemente et al., 2009),  
12 but are the result of the production of progesterone by the corpus luteum and its hepatic  
13 metabolism (Wiltbank et al., 2000). The data demonstrate that the levels of BHB at the  
14 beginning of the hormonal protocol do not influence the serum progesterone values of the  
15 fifth day after insemination. The saturation profile of circulating lipids interferes with the  
16 hepatic metabolism of progesterone (Piccinato et al., 2010) and precedes ketogenesis,  
17 which occurs after fat mobilization and the fall in serum glucose levels (LeBlanc, 2010),  
18 thus explaining the lack of correlation between BHB and progesterone levels.

19 BHB levels are the result of ketogenesis in response to conditions of  
20 hypoglycemia and increased accumulation of lipids in the liver, respectively called  
21 ketoses type I and type II by some authors (LeBlanc, 2010). Influence ( $P < 0.05$ ) of BHB  
22 on milk production was observed at the time of submission to the hormonal protocol  
23 (Figure 02). The increase in milk production is related to the increase in energy demands  
24 and, thus, the mobilization of body reserves, with a consequent increase in ketogenesis  
25 (Bell, 1995).

1 In conclusion, plasma levels of BHB at the beginning of the TAI protocol did not  
2 correlate with follicular growth, ovulation rate, and progesterone concentration on the  
3 fifth day after insemination. The results point to a reproductive behavior little influenced  
4 by the ketogenesis of the moment of submission to the TAI protocols. The present study  
5 demonstrates the effect of BHB levels at the time of TAI does not represent the  
6 deleterious effect of NEB throughout the postpartum period on reproduction.

#### 7 8 **COMMITTEE ON ETHICS AND BIOSAFETY**

9  
10 The procedures were submitted and approved by the Ethics Committee on Animal  
11 Use (CEUA) of the State University of Santa Catarina (UDESC), filed under CEUA n°  
12 2841210316.

#### 13 14 15 **REFERENCES**

16  
17 Bell A W, 1995: Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late  
18 pregnancy to Regulation of Organic Nutrient Late Pregnancy Metabolism During  
19 Transition from to Early. *J Anim Sci* **73**, 2804–2819,  
20 [http://cambridgefluids.com/action/displayFulltext?type=6&fid=1936220&jid=ANM](http://cambridgefluids.com/action/displayFulltext?type=6&fid=1936220&jid=ANM&volumeId=2&issueId=08&aid=1936216&fulltextType=RA&fileId=S1751731108002322)  
21 [&volumeId=2&issueId=08&aid=1936216&fulltextType=RA&fileId=S1751731108](http://cambridgefluids.com/action/displayFulltext?type=6&fid=1936220&jid=ANM&volumeId=2&issueId=08&aid=1936216&fulltextType=RA&fileId=S1751731108002322)  
22 [002322](http://cambridgefluids.com/action/displayFulltext?type=6&fid=1936220&jid=ANM&volumeId=2&issueId=08&aid=1936216&fulltextType=RA&fileId=S1751731108002322).  
23 Bodensteiner K J, Wiltbank M C, Bergfelt D R, Ginther O J, 1996: Alterations in  
24 follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral  
25 follicles. *Theriogenology* **45**, 499–512.

- 1 Butler S T, Pelton S H, Butler W R, 2004: Insulin increases 17 $\beta$ -estradiol production by  
2 the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. **127**, 537–  
3 545.
- 4 Butler W R, 2003: Energy balance relationships with follicular development ovulation  
5 and fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod Sci* **83**, 211–218.
- 6 Butler W R, Smith R D, 1989: Interrelationships between energy balance and postpartum  
7 reproductive function in dairy cattle. *J Dairy Sci* **72**, 767–783,  
8 [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79169-4](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79169-4).
- 9 Clemente M, De La Fuente J, Fair T, Al Naib A, Gutierrez-Adan A, Roche J F, Rizos D,  
10 Lonergan P, 2009: Progesterone and conceptus elongation in cattle: A direct effect  
11 on the embryo or an indirect effect via the endometrium?. **138**, 507–517.
- 12 Colazo M G, Ambrose D J, Kastelic J P, Small J A, 2008: Comparison of 2 enzyme  
13 immunoassays and a radioimmunoassay for measurement of progesterone  
14 concentrations in bovine plasma, skim milk, and whole milk. *Can J Vet Res* **72**, 32–  
15 36.
- 16 Diskin M G, Austin E J, Roche J F, 2002: Exogenous hormonal manipulation of ovarian  
17 activity in cattle. **23**, 211–228.
- 18 Drackley J K, 1999: ADSA foundation scholar award. Biology of dairy cows during the  
19 transition period: the final frontier?. *J Dairy Sci* **82**, 2259–2273,  
20 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10575597)  
21 [Citation&list\\_uids=10575597](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10575597).
- 22 Drackley J K, Dann H M, Douglas G N, Janovick Guretzky N A, Litherland N B,  
23 Underwood J P, Loor J J, 2005: Physiological and pathological adaptations in dairy  
24 cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital J*  
25 *Anim Sci* **4**, 323–344.

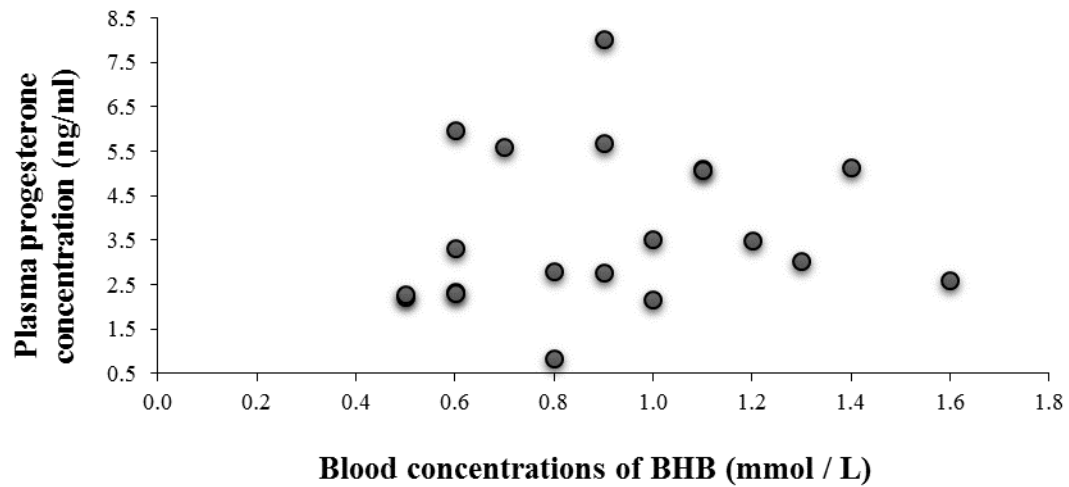
- 1 Garverick H a, Harris M N, Vogel-Bluel R, Sampson J D, Bader J, Lamberson W R,  
2 Spain J N, Lucy M C, Youngquist R S, 2013: Concentrations of nonesterified fatty  
3 acids and glucose in blood of periparturient dairy cows are indicative of pregnancy  
4 success at first insemination. *J Dairy Sci* **96**, 181–8,  
5 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23141836>.
- 6 Kawashima C, Matsui M, Shimizu T, Kida K, Miyamoto A, 2012: Nutritional Factors  
7 That Regulate Ovulation of the Dominant Follicle During the First Follicular Wave  
8 Postpartum in High-producing Dairy Cows. *J Reprod Dev* **58**, 10–16.
- 9 Kerestes M, Faigl V, Kulcsár M, Balogh O, Földi J, Fébel H, Chilliard Y, Huszenicza G,  
10 2009: Periparturient insulin secretion and whole-body insulin responsiveness in  
11 dairy cows showing various forms of ketone pattern with or without puerperal  
12 metritis. *Domest Anim Endocrinol* **37**, 250–261.
- 13 LeBlanc S, 2010: Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J*  
14 *Reprod Dev* **56 Suppl**, S29–S35.
- 15 Leroy J L M ., Vanholder T, Delanghe J ., Opsomer G, Van Soom A, Bols P E ., Dewulf  
16 J, de Kruif A, 2004: Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in  
17 high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology* **62**, 1131–1143.
- 18 Leroy J L M R, Vanholder T, Delanghe J R, Opsomer G, Van Soom A, Bols P E J, de  
19 Kruif A, 2004: Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-  
20 sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim*  
21 *Reprod Sci* **80**, 201–11,  
22 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432003001738>.
- 23 Leroy J L M R, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, de Kruif A,  
24 Genicot G, Van Soom A, 2005: Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy  
25 cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. **130**,

- 1 485–495.
- 2 Lopes A S, Butler S T, Gilbert R O, Butler W R, 2007: Relationship of pre-ovulatory  
3 follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy  
4 cows. *Anim Reprod Sci* **99**, 34–43.
- 5 Moussa M, Shu J, Zhang X H, Zeng F, 2015: Maternal control of oocyte quality in cattle  
6 ‘a review’. *Anim Reprod Sci* **155**, 11–27,  
7 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.01.011>.
- 8 Oetzel G R, 2004: Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Vet Clin*  
9 *North Am Food Anim Pract* **20**, 651–674,  
10 <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072004000556>.
- 11 Overton T R, Waldron M R, 2004: Nutritional Management of Transition Dairy Cows:  
12 Strategies to Optimize Metabolic Health. *J Dairy Sci* **87**, E105–E119,  
13 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030204700661>.
- 14 Piccinato C a, Sartori R, Sangsritavong S, Souza a H, Grummer R R, Luchini D,  
15 Wiltbank M C, 2010: In vitro and in vivo analysis of fatty acid effects on  
16 metabolism of 17beta-estradiol and progesterone in dairy cows. *J Dairy Sci* **93**,  
17 1934–43, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20412907>.
- 18 Pires J A A, Souza A H, Grummer R R, 2007: Induction of hyperlipidemia by intravenous  
19 infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows. *J Dairy Sci*  
20 **90**, 2735–44,  
21 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203020770084X>.
- 22 Rhoads R P, Kim J W, Leury B J, Baumgard L H, Segole N, Frank S J, Bauman D E,  
23 Boisclair Y R, 2004: Insulin increases the abundance of the growth hormone  
24 receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows. *J Nutr* **134**, 1020–  
25 1027.

- 1 Sartori R, Fricke P M, Ferreira J C, Ginther O J, Wiltbank M C, 2001: Follicular  
2 deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod* **65**,  
3 1403–1409.
- 4 Tanaka T, Akaboshi N, Inoue Y, Kamomae H, Kaneda Y, 2002: Fasting-induced  
5 suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion is related to body energy  
6 status in ovariectomized goats. *Anim Reprod Sci* **72**, 185–196,  
7 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843200200091X>.
- 8 Tanaka T, Nagatani S, Bucholtz D C, Ohkura S, Tsukamura H, Maeda K, Foster D L,  
9 2000: Central action of insulin regulates pulsatile luteinizing hormone secretion in  
10 the diabetic sheep model. *Biol Reprod* **62**, 1256–61,  
11 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775174>.
- 12 Thatcher W W, Bilby T R, Bartolome J A, Silvestre F, Staples C R, Santos J E P, 2006:  
13 Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* **65**, 30–  
14 44.
- 15 Voyvoda H, Erdogan H, 2010: Use of a hand-held meter for detecting subclinical ketosis  
16 in dairy cows. *Res Vet Sci* **89**, 344–351,  
17 <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.04.007>.
- 18 Walsh S W, Williams E J, Evans A C O, 2011: A review of the causes of poor fertility in  
19 high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci* **123**, 127–138,  
20 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.12.001>.
- 21 Wiltbank M C, Fricke P M, Sangsritavong S, Sartori R, Ginther O J, 2000: Mechanisms  
22 that Prevent and Produce Double Ovulations in Dairy Cattle. *J Dairy Sci* **83**, 2998–  
23 3007, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030200752015>.  
24  
25



1



2

3 Figure 01: Effect of plasma BHB levels from the initiation of the TAI protocol on serum  
4 progesterone concentration on the fifth day after insemination. The data (n = 18 cows)  
5 underwent regression analysis ( $P < 0.05$ ). No effect of BHB levels at the beginning of the  
6 TAI protocol on progesterone concentration on the fifth day after insemination was  
7 observed ( $P > 0.5$ ).

8

9

10

11

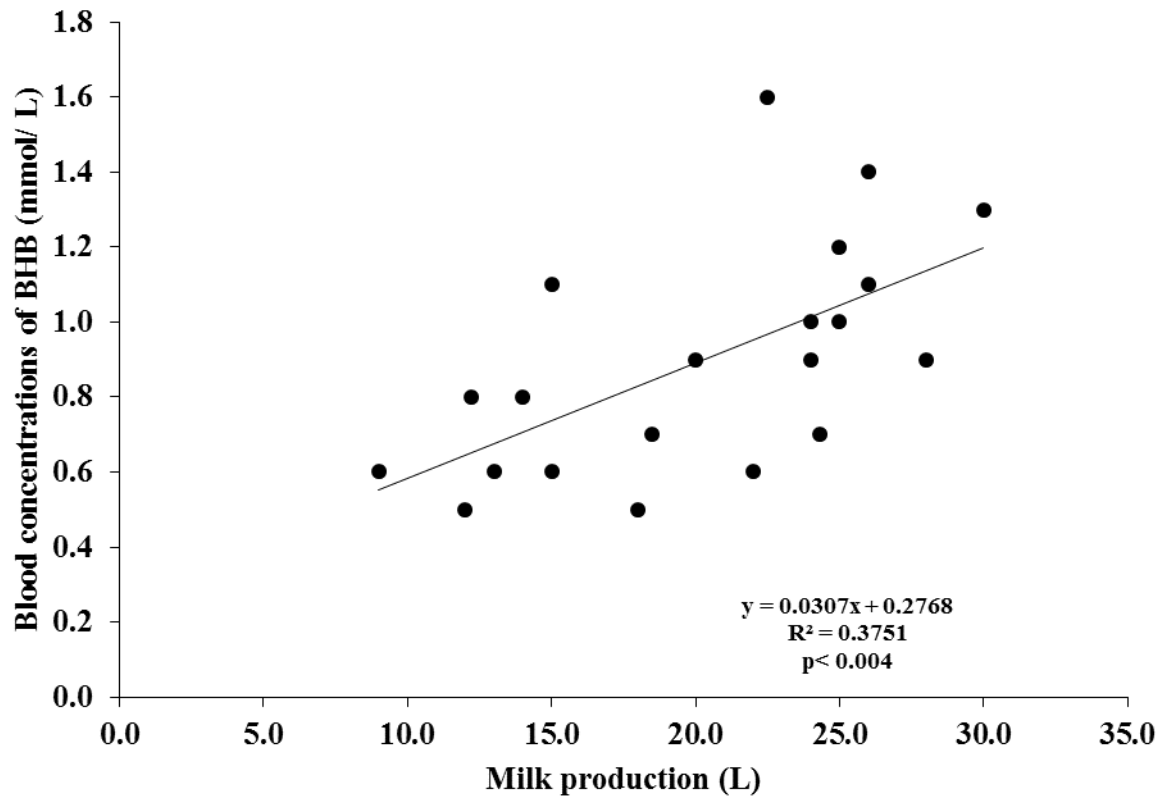
12

13

14

15

16



1

2 Figure 02: Effect of BHB serum levels from the initiation of the TAI protocol on mean  
 3 milk yield. Data (n = 18 cows) were analyzed by regression calculations evaluating the  
 4 effect of milk production on serum BHB levels. The effect of milk production on serum  
 5 BHB levels at the beginning of the TAI protocol was observed as a positive correlation  
 6 between the variables (P <0.004; R2 = 0.375).

7

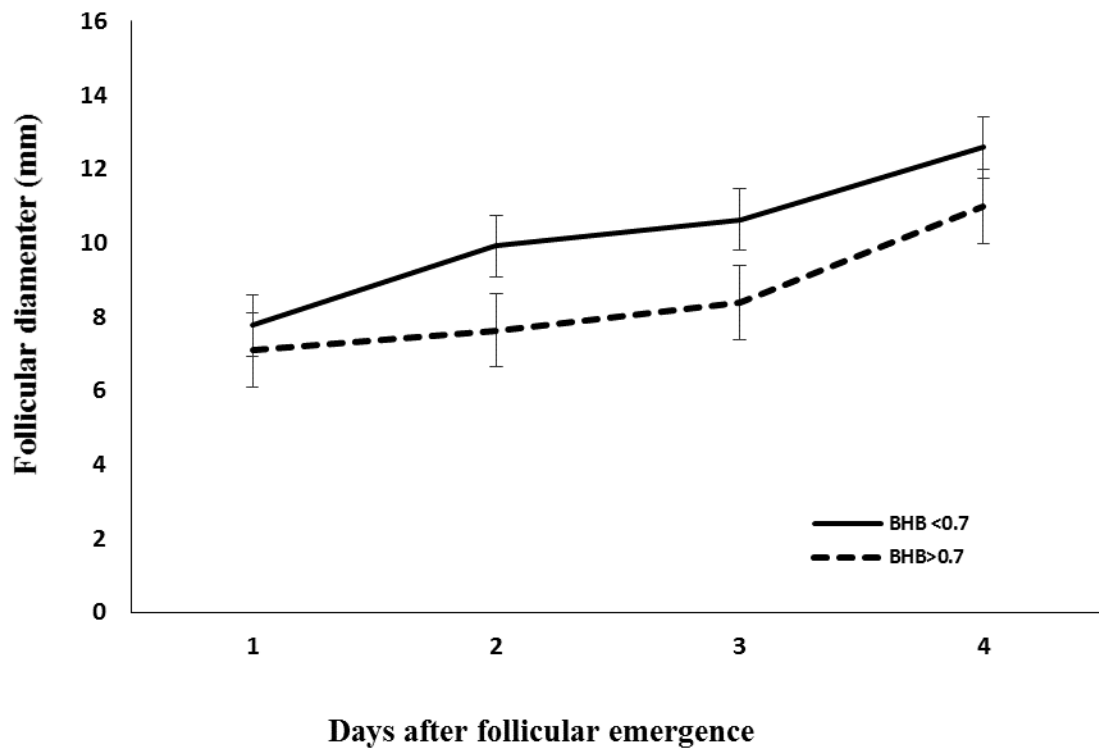
8

9

10

11

12



1

2 Figure 03: Effect of BHB on the initiation of the TAI protocol (mean 77.9 days  
 3 postpartum) on the follicular dynamics of dairy cows submitted to a fixed-time artificial  
 4 insemination protocol. The animals (n = 20 cows) were divided into two groups, BHB  
 5 <0.7 mmol / L and BHB> 0.7 mmol / L, with data analysis by model for logistic data. The  
 6 effect of BHB on the moment (days) was determined. No difference was observed  
 7 between follicular growth rate and no effect of BHB on the moment ( $P > 0.05$ ).

8

9

10

### 3- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os rebanhos modernos apresentam alta produção leiteira, demandas nutricionais elevadas e redução do consumo de alimentos, resultando em BEN. Nesta condição ocorre mobilização de NEFAs, resistência à insulina, desacoplamento do eixo somatotrópico e cetogênese, que comprometem a reprodução a curto e longo prazo. O efeito destas alterações pode ser parcialmente resolvido pelo emprego de protocolos hormonais, porém os prejuízos na competência oocitária e no ambiente uterino não são amenizados.

Abordagens que buscam redução na mobilização de reservas corporais são apontadas como formas de minimizar os problemas metabólicos e reprodutivos inflingidos pela alta produção. Caso a mobilização ultrapasse os limites toleráveis, os efeitos reprodutivos serão sentidos à longo prazo. O propósito deste estudo foi avaliar a utilização de ferramentas de triagem para melhorar o desempenho dos protocolos de IATF, porém o BHB como marcador da interação entre metabolismo e reprodução se mostrou inadequado quando avaliado no momento da abordagem hormonal.

O presente trabalho aponta para ausência de efeitos do BHB sobre a dinâmica folicular e a capacidade deste folículo ser ovulado. A teoria de Britt (1992) propôs pela primeira vez um efeito à longo prazo do BEN sobre a reprodução, porém não está claro quando e o que ocorre com os oócitos de vacas de alta produção. Vários trabalhos apontam para alterações epigenéticas e prejuízos na maturação molecular dos oócitos, comprometendo sua competência (O'DOHERTY et al., 2014).

No momento, os mecanismos moleculares ligados à alterações dos oócitos permanecem vagos, necessitado de pesquisas para a total compreensão do comportamento paracrino-autocrino do folículo sob efeito do BEN.

**REFERÊNCIAS**

- BAO, B. et al. Changes in Messenger Ribonucleic Acid Encoding Luteinizing Hormone Receptor, Cytochrome P450-Side Chain Cleavage, and Aromatase Are Associated with Recruitment and Selection of Bovine Ovarian Follicles'. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1158–1168, 1997.
- BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to Regulation of Organic Nutrient Late Pregnancy Metabolism During Transition from to Early. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 9, p. 2804–2819, 1995.
- BHATIA, B.; PRICE, C. A. Insulin alters the effects of follicle stimulating hormone on aromatase in bovine granulosa cells in vitro. **Steroids**, v. 66, n. 6, p. 511–519, jun. 2001.
- BO, G. A. et al. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology**, v. 40, n. 2, p. 225–239, ago. 1993.
- BO, G. A. et al. Follicular wave dynamics after estradiol-17 $\beta$  treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555–1569, 1994.
- BO, G. A. et al. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 31–40, 1995.
- BOBE, G.; YOUNG, J. W.; BEITZ, D. C. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 10, p. 3105–24, 2004.
- BODENSTEINER, K. J. et al. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. **Theriogenology**, v. 45, n. 2, p. 499–512, 1996.
- BRITT, J. H. (NORTH C. S. U. R. N. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. **Proceedings of the annual convention - American Association of Bovine Practitioners (USA)**, 1992.
- BUTLER, S. T.; PELTON, S. H.; BUTLER, W. R. Insulin increases 17 $\beta$ -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 537–545, 2004.
- BUTLER, W. R. Energy balance relationships with follicular development ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 83, n. 2–3, p. 211–

218, 2003.

BUTLER, W. R.; SMITH, R. D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 72, n. 3, p. 767–783, 1989.

CHILLIARD, Y. et al. **Ruminant physiology**. [s.l.: s.n.].

CLEMENTE, M. et al. Progesterone and conceptus elongation in cattle: A direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 507–517, 2009.

COLAZO, M. G. et al. Comparison of 2 enzyme immunoassays and a radioimmunoassay for measurement of progesterone concentrations in bovine plasma, skim milk, and whole milk. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 1, p. 32–36, 2008.

CONTRERAS, G. A. et al. Nonesterified fatty acids modify inflammatory response and eicosanoid biosynthesis in bovine endothelial cells. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 9, p. 5011–23, 2012.

CONTRERAS, G. A.; SORDILLO, L. M. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 3, p. 281–289, maio 2011.

DE KOSTER, J. D.; OPSOMER, G. Insulin Resistance in Dairy Cows. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 29, n. 2, p. 299–322, jul. 2013.

DISKIN, M. G.; AUSTIN, E. J.; ROCHE, J. F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. v. 23, p. 211–228, 2002.

DRACKLEY, J. K. ADSA foundation scholar award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? **J. Dairy Sci.**, v. 82, n. 11, p. 2259–2273, 1999.

DRACKLEY, J. K. et al. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. **Italian Journal of Animal Science**, v. 4, n. 4, p. 323–344, 2005.

DRACKLEY, J. K.; CARDOSO, F. C. Parturition and postpartum nutritional management to optimize fertility in high-yielding dairy cows in confined TMR systems. **animal**, v. 8, n. s1, p. 5–14, 9 maio 2014.

EVANS, A. C. O.; WALSH, S. W. The physiology of multifactorial problems limiting the establishment of pregnancy in dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 233–237, 2012.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 203–216, 2003.

FENWICK, M. A. et al. Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, n. 1, p. 31–44, 2008.

GINTHER, O. J. et al. Minireview Selection of the Dominant Follicle in Cattle. **Biology of reproduction**, v. 1194, p. 1187–1194, 1996.

GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 239–257, 2003a.

GINTHER, O. J. et al. **Mechanism of follicle deviation in monovular farm species** **Animal Reproduction Science**, out. 2003b. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432003000939>>. Acesso em: 6 out. 2016

GONZÁLEZ, F. D. et al. Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. **Journal of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 251–255, 2011.

GRUMMER, R. R.; MASHEK, D. G.; HAYIRLI, A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 20, n. 3 SPEC. ISS., p. 447–470, 2004.

KARSCH, F. J. Regulation of Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone. **Annu. Rev. Physiol**, v. 49, p. 365–382, 1987.

KAWASHIMA, C. et al. Nutritional Factors That Regulate Ovulation of the Dominant Follicle During the First Follicular Wave Postpartum in High-producing Dairy Cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 1, p. 10–16, 2012.

KERESTES, M. et al. Periparturient insulin secretion and whole-body insulin responsiveness in dairy cows showing various forms of ketone pattern with or without puerperal metritis. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, n. 4, p. 250–261, 2009.

KIMURA, K.; REINHARDT, T. A; GOFF, J. P. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 7, p. 2588–2595, 2006.

LEBLANC, S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **The Journal of reproduction and development**, v. 56 Suppl, p. S29–S35, 2010.

LEBLANC, S. J. Interactions of Metabolism, Inflammation, and Reproductive Tract Health in the Postpartum Period in Dairy Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL. 5, p. 18–30, 2012.

LEROY, J. L. M. . et al. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in

high-yielding dairy cows early post partum. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1131–1143, 2004a.

LEROY, J. L. M. R. et al. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows.

**Animal reproduction science**, v. 80, n. 3–4, p. 201–11, fev. 2004b.

LEROY, J. L. M. R. et al. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, v. 130, n. 4, p. 485–495, 2005.

LEROY, J. L. M. R. et al. The in vitro development of bovine oocytes after maturation in glucose and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 2, p. 119–123, 2006.

LEROY, J. L. M. R. et al. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 5, p. 612–622, 2008.

LEWIS, G. F. et al. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Endocr Rev**, v. 23, n. 2, p. 201–229, 2002.

LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1594–1601, 2011.

LOPES, A. S. et al. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 1–2, p. 34–43, 2007.

LUCY, M. C.; MCDOUGALL, S.; NATION, D. P. The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 495–512, 2004.

MIHM, M. et al. Follicle wave growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 4, p. 191–200, 2002.

MOUSSA, M. et al. Maternal control of oocyte quality in cattle “a review”. **Animal Reproduction Science**, v. 155, p. 11–27, 2015.

MULLIGAN, F. J.; DOHERTY, M. L. Production diseases of the transition cow. **Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 3–9, 2008.

NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–29, 2000.

O'DOHERTY, A. M. et al. Negative energy balance affects imprint stability in oocytes



- recovered from postpartum dairy cows. **Genomics**, v. 104, n. 3, p. 177–185, 2014.
- OETZEL, G. R. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 3, p. 651–674, nov. 2004.
- VERTON, T. R.; WALDRON, M. R. Nutritional Management of Transition Dairy Cows: Strategies to Optimize Metabolic Health. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. June 2003, p. E105–E119, 2004.
- PFEIFER, L. F. M. et al. Timed artificial insemination in blocks: A new alternative to improve fertility in lactating beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 163, p. 89–96, dez. 2015.
- PICCINATO, C. A et al. In vitro and in vivo analysis of fatty acid effects on metabolism of 17beta-estradiol and progesterone in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 5, p. 1934–43, 2010.
- PIRES, J. A. A.; SOUZA, A. H.; GRUMMER, R. R. Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 6, p. 2735–44, 2007.
- RHOADS, R. P. et al. Insulin increases the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 5, p. 1020–1027, 2004.
- RICHTER, T. A. et al. Progesterone can block the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinising hormone surge in the ewe by a direct inhibitory action on oestradiol-responsive cells within the hypothalamus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 17, n. 3, p. 161–169, 2005.
- ROCHE, J. F.; MACKAY, D.; DISKIN, M. D. Reproductive management of postpartum cows. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 703–712, 2000.
- SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403–1409, 2001.
- SATTERFIELD, M. C. Progesterone Regulation of Preimplantation Conceptus Growth and Galectin 15 (LGALS15) in the Ovine Uterus. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 2, p. 289–296, 2006.
- SHELDON, I. M. et al. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516–1530, 2006.
- SHI, X. et al.  $\beta$ -Hydroxybutyrate Activates the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway to Promote the Expression of Pro-Inflammatory Factors in Calf Hepatocytes. **Cellular Physiology and**

**Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 920–932, 2014.

SHI, X. et al. NEFAs activate the oxidative stress-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway to induce inflammatory response in calf hepatocytes. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 145, p. 103–12, jan. 2015.

SINGER, P. L. **Pathways To pregnancy and parturition**. 2<sup>o</sup> edition ed. Washington: [s.n.]. v. 3

SIQUEIRA, L. C. et al. Effects of estradiol and progestins on follicular regression before, during, and after follicular deviation in postpartum beef cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 614–619, 2009.

SORDILLO, L. M.; RAPHAEL, W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 29, n. 2, p. 267–278, 2013.

SPENCER, T. E. et al. Progesterone and Placental Hormone Actions on the Uterus: Insights from Domestic Animals. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 1, p. 2–10, 2004.

STRÜVE, K. et al. The effect of metritis on luteal function in dairy cows. **BMC veterinary research**, v. 9, p. 244, 2013.

TANAKA, T. et al. Central action of insulin regulates pulsatile luteinizing hormone secretion in the diabetic sheep model. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1256–61, 2000.

TANAKA, T. et al. Fasting-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion is related to body energy status in ovariectomized goats. **Animal Reproduction Science**, v. 72, n. 3–4, p. 185–196, ago. 2002.

THATCHER, W. W. et al. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 30–44, 2006.

VAN HOECK, V. et al. Reduced oocyte and embryo quality in response to elevated non-esterified fatty acid concentrations: A possible pathway to subfertility? **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 1–2, p. 19–29, 2014.

VELAZQUEZ, M. A.; SPICER, L. J.; WATHES, D. C. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 35, n. 4, p. 325–342, 2008.

VOYVODA, H.; ERDOGAN, H. Use of a hand-held meter for detecting subclinical ketosis in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 89, n. 3, p. 344–351, 2010.

WALSH, S. W.; WILLIAMS, E. J.; EVANS, A. C. O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 3–

4, p. 127–138, 2011.

WATHES, D. C. et al. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. **Theriogenology**, v. 68, n. SUPPL. 1, p. S232–S241, 2007.

WILTBANK, M. et al. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 17–29, 2006.

WILTBANK, M. C. et al. Mechanisms that Prevent and Produce Double Ovulations in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 12, p. 2998–3007, dez. 2000.

WILTBANK, M. C. et al. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows.

**Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1568–1582, 2011.

# CARTA DE APROVAÇÃO DO CETEA



**UDESC**  
UNIVERSIDADE  
DO ESTADO DE  
SANTA CATARINA

**LAGES**  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
AGROVETERINÁRIAS

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Uso de marcadores sanguíneos de balanço energético negativo como ferramenta de triagem de vacas leiteiras submetidas a protocolo de inseminação artificial em tempo fixo.", protocolada sob o CEUA nº 2841210316, sob a responsabilidade de Rogério Ferreira - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 05/05/2016.

We certify that the proposal "Use of blood markers of negative energy balance as dairy cows screening tool undergoing artificial insemination protocol at fixed time.", utilizing 100 Bovines (100 females), protocol number CEUA 2841210316, under the responsibility of Rogério Ferreira - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 05/05/2016.

Finalidade da Proposta: *Pesquisa (Acadêmica)*

Vigência da Proposta: de 06/2016 a 11/2016      Área: *Zootecnia*

Origem: *Animais provenientes de estabelecimentos comerciais*

Espécie: *Bovinos*      sexo: *Fêmeas*      Idade: *2 a 7 anos*      N: *100*

Linhagem: *Holandesa*      Peso: *380 a 750 kg*

Resumo: A seleção de animais de alto desempenho leiteiro levou a redução na capacidade reprodutiva, pois estes indivíduos apresentam alterações metabólicas que comprometem a reprodução. Animais com altos níveis de produção possuem variadas concentrações séricas de ácidos graxos não esterificados (NEFAs) e 7-hidroxi-butilirato, apresentando redução na capacitação oocitária e na sobrevivência embrionária, o que reduz as taxas de concepção. O uso de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é uma opção para melhorar dos índices reprodutivos, porém seus resultados são variados. Esta variabilidade nos resultados pode estar relacionada com o stress metabólico e o balanço energético desses animais. A proposta do presente estudo é utilizar marcadores do balanço energético como ferramenta de triagem para prever os animais com capacidade de responder de forma satisfatória aos protocolos de indução hormonal do estro. A hipótese do presente estudo é que os níveis de 7-hidroxi-butilirato e NEFAs são indicadores da capacidade de resposta de vacas leiteiras de alta produção a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo, podendo ser usados como ferramenta de triagem. Com vacas leiteiras, sem nenhuma alteração genital serão submetidas a protocolo de IATF, onde avaliaremos o nível de NEFAs, 7-hidroxi-butilirato, a dinâmica folicular, os níveis de progesterona no quinto dia pós inseminação e as taxas de prenhez. Ainda será determinado o escore de condição corporal, dias pós parto, produção leiteira e a apresentação de cio prévio. A presente pesquisa propõe estabelecer o uso de indicadores do status metabólico como ferramenta de triagem, possibilitando estimar a capacidade de resposta de vacas leiteiras a protocolos de IATF.

Local do experimento: *Propriedades do Oeste Catarinense no entorno das cidades de Galvão, Jupia, São Domingos e Coronel Martins com média de 30 animais em lactação, e atividade principal a bovinocultura leiteira.*

Lages, 14 de fevereiro de 2017

Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina