

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

ISADORA MACHADO TEIXEIRA LIMA

RESPOSTA REPRODUTIVA DE CABRAS DA RAÇA ANGLO-NUBIANA
SUBMETIDAS À ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA ANTES E APÓS A
MONTA NATURAL

FORTALEZA-CE
2008

ISADORA MACHADO TEIXEIRA LIMA

RESPOSTA REPRODUTIVA DE CABRAS DA RAÇA ANGLO-NUBIANA
SUBMETIDAS À ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA ANTES E APÓS A
MONTA NATURAL

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: Prof. Dr. Davide Rondina

FORTALEZA-CE

2008

ISADORA MACHADO TEIXEIRA LIMA

RESPOSTA REPRODUTIVA DE CABRAS DA RAÇA ANGLO-NUBIANA
SUBMETIDAS À ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA ANTES E APÓS A
MONTA NATURAL

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: 18 / 12 / 2008

Banca Examinadora

Prof. Dr. Davide Rondina
Orientador – UECE

Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo
Examinador – UECE

Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira
Examinador – UECE

Dra. Carminda Sandra B. S. Vanderley
Examinadora – UECE

*Dedico essa inestimável conquista às pessoas mais importantes de minha vida,
maiores exemplos de caráter e luta: meus pais.*

Célia Maria Machado de Brito

Otacílio Teixeira Lima Neto

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por sempre iluminar os meus caminhos, me dando serenidade e força para seguir em frente, sem nunca desistir de meus objetivos. Embora muitas vezes eu tenha falhado e deixado de agradecer por todas as Suas bênçãos, Ele tem permanecido aqui, sempre ao meu lado.

Agradeço aos meus pais queridos, Célia Maria Machado de Brito e Otacílio Teixeira Lima Neto, por serem os grandes incentivadores na minha caminhada rumo à pós-graduação e pela ajuda incondicional. Sem eles, eu não teria conseguido.

Agradeço a toda minha família, especialmente às minhas avós Zuíla do Nascimento Teixeira Lima (*in memoriam*) e Clotilde Machado de Brito, pelo constante apoio às minhas atividades acadêmicas e de pesquisa, que muito contribuiu para minha permanência sempre firme em tudo que eu me propunha a realizar e, com toda certeza, me impulsionou para a concretização de mais esta importante etapa, o mestrado.

Agradeço ao meu namorado Francisco Atualpa Soares Júnior, por ter me escutado e me aconselhado em todos os momentos que me senti desmotivada, me dando forças e tentando sempre me mostrar o melhor caminho em todas as situações. Sua presença e suas palavras foram fundamentais nesse último ano de mestrado.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Davide Rondina, que me acompanhou desde a iniciação científica até o mestrado, por todos os ensinamentos, cobranças, conselhos e momentos de seriedade e alegria que nossos quase seis anos de convivência me proporcionaram. Serei eternamente grata, professor, pela oportunidade e confiança.

Agradeço aos meus co-orientadores, Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo e Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira, pela disponibilidade e importante contribuição na realização do meu mestrado.

Agradeço ao Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas e ao Prof. Dr. Edílson Soares Lopes Júnior pelos importantes ensinamentos durante o meu período de estágio no Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR), ainda como iniciação científica, e por sem dúvida terem contribuído sobremaneira na minha escolha pela área da pesquisa.

Agradeço aos antigos e atuais componentes do Laboratório de Nutrição e Produção de Ruminantes (LANUPRUMI), Anderson Pinto Almeida, Érika da Silva Bezerra de Menezes, Magda Regina Corrêa Rodrigues, Aline Lima de Souza, Iracelma Julião de Arruda, Elizabeth Saraiva Peixoto Pinheiro, Liliane Moreira Silva, Camila Pontes Albuquerque, Célio Souza da Rocha, José Moreira Lima Neto, Paulo Rafael Cardoso Correia, Lucas Diniz Gonçalves, Alana Nogueira Godinho, Aline Maia Silva, César Carneiro Linhares Fernandes, Alline Barbosa Leal, Erikelto Ferreira Luna Filho, Jardel Cavalcante Lemos, Antonnio Henrique Afonso Alves e Lídia da Paz Palácio, pelo apoio e amizade e, principalmente, por me proporcionarem a virtude do trabalho em equipe.

Agradeço à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), especialmente ao coordenador Marcos Fábio Gadelha Rocha e à ex-coordenadora Maria Fátima da Silva Teixeira, por todo o auxílio fornecido a nós alunos durante os dois anos de vínculo a este programa.

Agradeço enormemente aos funcionários da Fazenda Campo da Semente, Francisco Juscelino Maciel Cavalcanti, Israel de Souza Lima e Expedito Ferreira de Araújo, por serem os principais colaboradores na execução do meu experimento de mestrado, sempre se mostrando disponíveis a cuidar dos animais experimentais e a me auxiliar em todas as atividades necessárias para o bom andamento do meu trabalho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro durante todo o mestrado acadêmico.

Agradeço, enfim, a todas as pessoas que contribuíram ou mesmo torceram para a efetivação desse sonho. Muito Obrigada!

RESUMO

Evidências indicam que os níveis de insulina plasmática influenciam a sobrevivência embrionária e o desenvolvimento do concepto. O objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos de uma única e de repetidas administrações de insulina sobre a sobrevivência embrionária, taxa de concepção e desenvolvimento fetal de cabras da raça Anglo-Nubiana. Trinta e uma cabras desta raça tiveram o estro sincronizado por meio de duas administrações de 100 µg de cloprostenol, intervaladas por 11 dias. Após a sincronização, dois bodes foram utilizados para a detecção do estro e montas naturais. Nesse período, todas as cabras receberam administrações de insulina humana de longa duração (0,2UI/kgPV/dia): as fêmeas do primeiro grupo (Insulina I) (n = 10) foram submetidas à uma única administração de insulina, concomitante à segunda aplicação de cloprostenol (Dia 0); as cabras do segundo grupo (Insulina III) (n = 11) receberam três aplicações de insulina (Dias 0, 3 e 6) e as cabras do terceiro grupo (Insulina IV) (n = 10) foram sujeitas a quatro aplicações (Dias 0, 3, 6 e 9). Colheitas de sangue foram realizadas nos Dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10. O diagnóstico de gestação e as mensurações dos conceptos e placentomas foram realizadas aos 30, 45 e 60 dias após a monta. Após a parição, a prolificidade, tipo de parto e peso das crias foram registrados. No grupo Insulina I, 70% (7/10) das fêmeas exibiram estro e foram montadas, comparado a 100% das fêmeas nos grupos Insulina III e Insulina IV (21/21). As mudanças cumulativas de insulina plasmática e os níveis de progesterona nas cabras gestantes aumentaram positivamente, não sendo observado efeito dos tratamentos ($P > 0,05$). O grupo Insulina I apresentou maiores taxas de concepção e do concepto (85,71% e $1,71 \pm 0,18$) ($P < 0,05$). O efeito da insulina foi significativo no diâmetro dos placentomas e vesículas ($P < 0,05$), porém não determinou diferenças entre tratamentos em relação ao comprimento crânio-caudal e diâmetro biparietal fetais ($P > 0,05$). A prolificidade ao parto e a proporção de partos múltiplos foram similares entre grupos ($P > 0,05$). Nos cabritos machos, o grupo Insulina I apresentou menor peso ao nascimento em relação ao Insulina IV ($P < 0,05$). Em conclusão, uma única administração de insulina antes da monta natural promove melhores índices de sobrevivência embrionária, com maiores taxas de concepção, em relação a administrações repetidas de insulina antes e após a fecundação. Diferentes administrações de insulina não influenciam o tamanho do feto, a frequência de partos múltiplos e a prolificidade ao parto.

Palavras-chave: Caprinos. Insulina. Embrião. Desenvolvimento fetal. Prolificidade.

ABSTRACT

Evidences indicate that plasma insulin levels influence the embryo survival and conceptus development. Thus, the aim of this study was to compare the effects of an unique insulin administration and of repeated insulin administrations on embryo survival, conception rate and fetal development in Anglo-Nubian goats. Thirty-one Anglo-Nubian goats had their estrus synchronized by two i.m. administrations of 100 µg cloprostenol, 11 days apart. After synchronization, two bucks were mixed with the goats to detect estrus and mating. In this period, all goats were treated with human long acting insulin (0.2IU/kgBW/day): animals from the first group (Insulin I) (n = 10) were submitted to a unique insulin administration at second cloprostenol injection (Day 0); goats from second group (Insulin III) (n = 11) received three insulin administrations (Days 0, 3 and 6) and the goats of third group (Insulin IV) (n = 10) were treated with four insulin doses (Days 0, 3, 6 and 9). Blood samples were collected at Days 0, 2, 4, 6, 8 and 10 for hormonal assay. Pregnancy diagnosis and measurements of conceptus and placentomes were performed at 30, 45 and 60 days after mating by ultrasonography. After kidding, litter size, type of parturition and kids birth weight were recorded. In Insulin I group, 70% (7/10) of females exhibited estrus and were mated compared to 100% of females in Insulin III and IV groups (21/21). Insulin cumulative changes and progesterone levels in pregnant does increased positively, with no effect of the treatment ($P > 0.05$). Insulin I showed higher conception and conceptus rates (85.71% and 1.71 ± 0.18) ($P < 0.05$). The effect of insulin was significant in the diameter of placentomes and vesicles ($P < 0.05$), however did not cause differences between treatments regarding to fetus crown-rump length and biparietal diameter ($P > 0.05$). Litter size and proportion of multiple parturitions were similar between groups ($P > 0.05$). In the male kids, Insulin I had a lower birth weight when compared to Insulin IV ($P < 0.05$). In conclusion, a single insulin administration before mating causes better embryo survival, with higher conception rates, in respect to repeated insulin administrations before and after fecundation. Different insulin administrations do not affect fetus size, multiple parturition frequency and litter size.

Keywords: Goats. Insulin. Embryo. Fetal development. Litter size.

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1. Efeitos dos fatores de crescimento sobre o desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões mamíferos durante a pré-implantação.....	39

LISTA DE FIGURAS

<i>Revisão de Literatura</i>	Pág.
Figura 1. Esquema ilustrativo do desenvolvimento embrionário durante o período de pré-implantação.....	18
Figura 2. Diferentes estádios do desenvolvimento embrionário durante o período de pré-implantação: (A) Zigoto; (B) Embrião de 2 células; (C) Embrião de 4 células; (D) Embrião de 8 células; (E) Mórula compacta.....	18
Figura 3. Embrião no estágio de blastocisto, aproximadamente no dia 5 de desenvolvimento. Nesse estágio, há a diferenciação de células do trofotoderma (1) e da massa celular interna (2), com formação de uma cavidade blastocística (CB) ou blastocele.....	20
Figura 4. Ativação do genoma embrionário, caracterizada pela substituição gradual da atividade transcripcional materna pela atividade transcripcional do embrião. Em ruminantes, a ativação do genoma ocorre no estágio de 8 a 16 células, como demonstrado na figura.....	22
Figura 5. Via fisiológica desencadeadora de possíveis alterações reprodutivas nas diferentes espécies domésticas, observada principalmente em vacas leiteiras durante o período de lactação.....	36
Figura 6. Identificação de receptores para o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) em diferentes estádios embrionários durante a pré-implantação: (A) Embrião de 8 células; (B) Mórula inicial; (C) Blastocisto; (D) IgG utilizada como anticorpo primário para a coloração dos blastocistos. A cor verde fluorescente indica maior intensidade de coloração.....	41
Capítulo 1	
Figura 1. Percentage of goats marked at mating according to the insulin group. Distribution of goat marked (%) (n = 28) (Grey mark) and cumulative percentage of goats marked/exposed (n = 31) (Dark mark), according to the time (hours) from second PGF _{2α} dose. ^{a,b} P < 0.05.....	63

Figura 2.	Mean cumulative changes of insulin and progesterone levels according to the days from second PGF _{2α} dose in pregnant goats (n = 12) treated with single or repeated administration of insulin. Data from No Pregnant group are referred to animals (n = 5) with gestation failure detected at 30 days of pregnancy. Values are given in means ± SEM.....	64
-----------	---	----

Anexos

Figura 1.	Fazenda experimental Campo da Semente e suas instalações.....	97
Figura 2.	(A) Fêmeas experimentais; (B) Bode experimental; (C) Bode utilizando marcador impregnado com tinta; (D) Detecção de estro das fêmeas; (E) Fêmeas marcadas após a monta natural.....	98
Figura 3.	Procedimentos com as fêmeas experimentais. (A) Aplicação subcutânea de insulina; (B) Colheita de sangue para dosagens hormonais; (C) Diagnóstico de gestação por ultra-sonografia transretal.....	99
Figura 4.	Nascimento das crias ao término do experimento.....	100

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Conception rate (%) and conceptus rate (n) from 30 to 60 days of gestation in goats treated with single or repeated doses of insulin. Values of conceptus rate are given in means \pm SEM.....	65
Tabela 2. Placenta and fetus traits from 30 to 60 days of gestation in goats treated with single or repeated doses of insulin. Values are given in means \pm SEM.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura	Significado
AQP	Aquaporinas
ATP	Adenosina tri-fosfato
BPD	Diâmetro biparietal
BW	Peso corporal
CB	Cavidade blastocística
CBP	Fator de transcrição CBP
CNPq	Cons. Nac. de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CRL	Comprimento crânio-caudal
CSF-1	Fator estimulador de colônias 1
EGFs	Fatores de crescimento epidermal
FGFs	Fatores de crescimento de fibroblastos
GH	Hormônio do crescimento
GLM	Modelo Linear Generalizado
GLUTs	Transportadores de glicose facilitadores
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
HB-EGF	Fator de crescimento epidermal de ligação à heparina
i.m.	Intramuscular
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN τ	Interferon <i>tau</i>
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina I
IGF-II	Fator de crescimento semelhante à insulina II
IGFs	Fatores de crescimento semelhantes à insulina
IgG	Imunoglobulina G
Ins.I	Grupo Insulina I
Ins.III	Grupo Insulina III
Ins.IV	Grupo Insulina IV
UI	Unidade internacional
JA	Junções de adesão

kDa	Kilodalton
Kg	Kilograma
LH	Hormônio luteinizante
MCI	Massa celular interna
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mRNA	RNA mensageiro
mTEA-2	Fator de transcrição mTEA-2
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Enzima sódio potássio - ATPase
ng	Nanograma
OPNs	Osteopontinas
P-450	Sistema enzimático do citocromo P-450
pg	Picograma
PGDH	Prostaglandina desidrogenase
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGFM	Metabólito da prostaglandina F _{2α}
PGHS	Prostaglandina G/H sintetase
pH	Potencial hidrogeniônico
PV	Peso Vivo
RIA	Radioimunoensaio
SAS	Sistema de Análise Estatística
SEM	Erro médio padrão
Sp1	Fator de transcrição Sp1
TBP	Fator de transcrição TBP
TGFs	Fatores de crescimento transformadores
TGF α	Fator de crescimento transformador α
TNFs	Fatores de necrose tumoral
UTMPs	Proteínas do leite uterino ovino
Vs.	Versus
μ g	Micrograma
μ U	Microunidade

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE QUADROS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Fatores que Regulam o Desenvolvimento Embrionário no Período de Pré-Implantação.....	17
2.2 Sobrevivência Embrionária e Fertilidade em Ruminantes.....	28
3 JUSTIFICATIVA.....	44
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	45
5 OBJETIVOS.....	46
5.1 Objetivo Geral.....	46
5.2 Objetivos Específicos.....	46
6 CAPÍTULO 1.....	47
7 CAPÍTULO 2.....	67
8 CONCLUSÕES GERAIS.....	71
9 PERSPECTIVAS.....	72
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
11 ANEXOS.....	97

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a caprinocultura vem se destacando como uma das principais atividades econômicas exercidas por pequenos e grandes produtores de carne, leite e pele em todo o mundo. Entretanto a região Nordeste, caracterizada por concentrar em torno de 92,4% da população caprina do Brasil (IBGE, 2006), ainda enfrenta sérios entraves no que concerne à obtenção de elevados índices de produtividade nesta espécie. Um dos principais fatores determinantes deste quadro é o manejo nutricional deficiente empregado em grande parte das criações, o qual vem refletir, sobretudo, em uma baixa eficiência reprodutiva dos rebanhos.

Em ruminantes, a nutrição influencia diretamente a fertilidade através do fornecimento de nutrientes específicos requeridos para os processos de desenvolvimento oocitário, ovulação, fertilização, sobrevivência embrionária e estabelecimento da gestação. A fertilidade sofre, ainda, efeitos nutricionais indiretos por meio do impacto dos nutrientes sobre as concentrações de hormônios e metabólitos circulantes, fundamentais para o sucesso destes processos (Robinson *et al.*, 2006) e para a conseqüente produção de crias viáveis.

Grande parte da perda potencial das crias está concentrada no período embrionário, particularmente durante a pré-implantação. A mortalidade embrionária nesta fase é reconhecida como a maior causa de falha reprodutiva em ruminantes, resultando em poucas crias nascidas, menor progresso genético e significativa perda econômica. Nesse contexto, é geralmente aceito que os índices de fertilização estão na ordem de 90% e que as perdas embrionárias se encontram na faixa de 29 a 39% após a fertilização, com a maioria destas ocorrendo entre os dias 8 e 16 pós-inseminação ou cobertura (Dunne *et al.*, 2000).

Diante da relevância da viabilidade embrionária na gestação inicial para a obtenção de uma melhor fertilidade, e subseqüente incremento dos índices reprodutivos e produtivos, o presente trabalho abordará, como revisão de literatura, os fatores que regulam o desenvolvimento embrionário no período de pré-implantação, incluindo as mudanças morfofisiológicas do embrião, os efeitos da nutrição histotrófica e o metabolismo embrionário, bem como o papel de importantes hormônios, como a progesterona, prostaglandina F_{2α} e metabólitos, sobre a sobrevivência embrionária em ruminantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fatores que Regulam o Desenvolvimento Embrionário no Período de Pré-Implantação

2.1.1 Mudanças na Morfofisiologia do Embrião durante seu Desenvolvimento Inicial

O período de pré-implantação corresponde ao intervalo entre a fertilização e a implantação do embrião, sendo caracterizado como um período de vida livre de desenvolvimento embrionário no oviduto e no útero (Watson *et al.*, 2004) (Figuras 1 e 2). O estágio embrionário inicial do período de pré-implantação (zigoto) e o estágio final (blastocisto) diferem tanto em termos de morfologia, quanto em relação às características fisiológicas e bioquímicas. As duas maiores mudanças morfológicas que ocorrem no embrião durante esse período são a compactação e o desenvolvimento da blastocela. Entretanto, associado a tais eventos está a ativação seqüencial do genoma embrionário (Telford *et al.*, 1990), a qual resulta em inativação da atividade transcricional materna e aumento na atividade biossintética do conceito (embrião/feto e membranas associadas; Frei *et al.*, 1989). A importância deste conjunto de eventos em termos de mudanças nos requerimentos nutricionais embrionários deve ser considerada, visto que uma melhor compreensão destes pode contribuir, sobretudo, para elucidar as mudanças nas preferências nutricionais e na utilização de nutrientes pelo embrião durante o seu desenvolvimento.

Anteriormente à compactação, os blastômeros dos embriões em estágio de clivagem estão ainda pouco aderidos uns aos outros, chegando a sofrer dispersão em caso de remoção da zona pelúcida. Tal característica tem implicações profundas nos mecanismos de homeostase que podem ser utilizados pelo embrião. De fato, antes da compactação os blastômeros se encontram semelhantes a organismos unicelulares, no que concerne aos métodos utilizados por estes para manutenção da função celular (Gardner, 1997). A compactação, por sua vez, representa a formação do primeiro epitélio de transporte do conceito (Biggers *et al.*, 1988), estando envolvida no estabelecimento da polaridade dos blastômeros e, portanto, indicando uma mudança nos mecanismos homeostáticos disponíveis para o embrião. É caracterizada por um aumento do contato celular entre blastômeros, o qual permanece até o total desaparecimento dos limites celulares individuais (Watson & Barcroft, 2001; Stanton *et al.*, 2003).

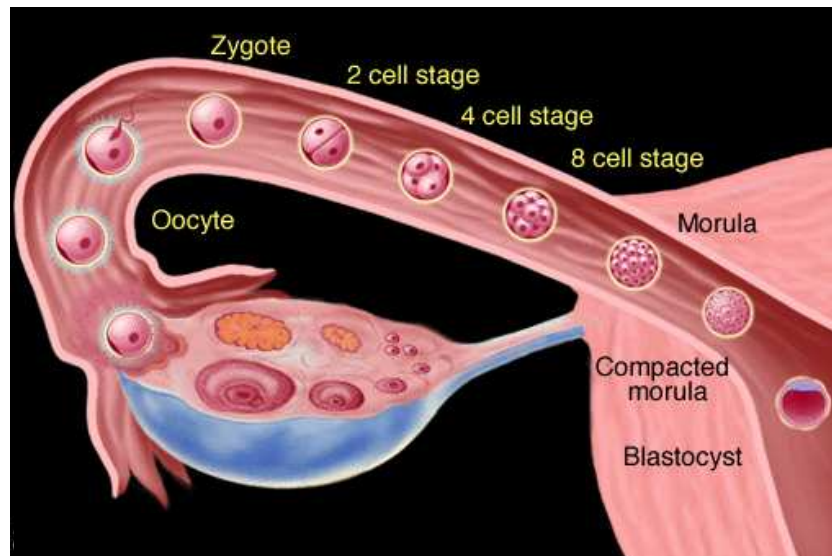


Figura 1. Esquema ilustrativo do desenvolvimento embrionário durante o período de pré-implantação (Adaptado a partir de Crump Institute for Biological Imaging; web.cena.usp.br).

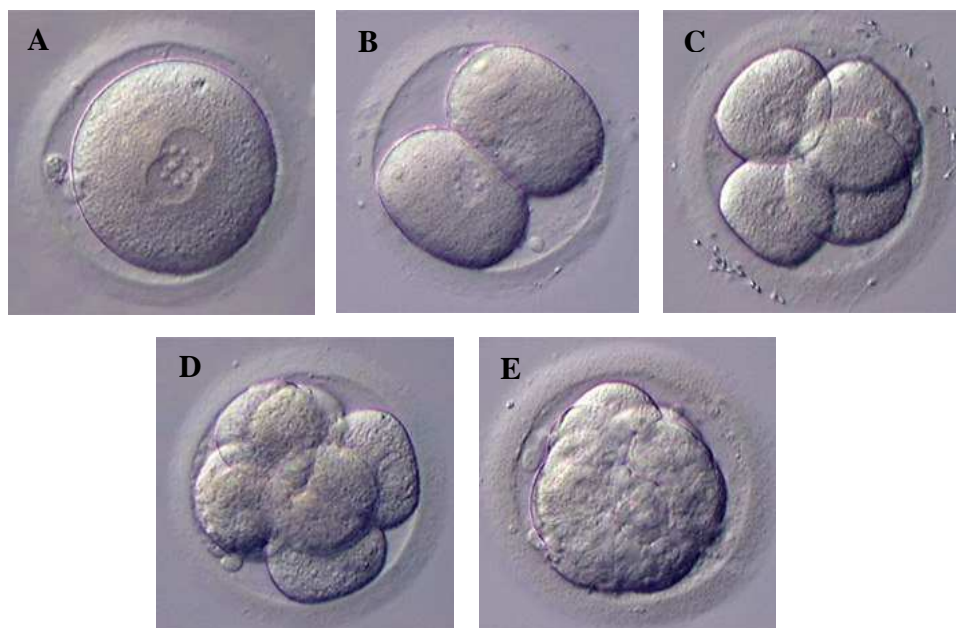


Figura 2. Diferentes estádios do desenvolvimento embrionário durante o período de pré-implantação: (A) Zigoto; (B) Embrião de 2 células; (C) Embrião de 4 células; (D) Embrião de 8 células; (E) Mórula compacta (Adaptado a partir de Laboratoire de Biologie de la Reproduction; Lausanne, www.embryology.ch).

As junções de adesão (JA) são essenciais para o estabelecimento da adesão celular durante a compactação e precedem a formação de outros contatos celulares, tais como desmosomos e junções *tight*. As JA são estruturas heteroméricas complexas compostas de caderinas, uma superfamília de proteínas transmembrana (Kemler, 1993), representada principalmente pela E-caderina. A porção citoplasmática das caderinas interage com outras moléculas, denominadas de β ou γ cateninas, as quais ligam as JA à microfilamentos de actina via α -catenina (Kemler, 1993). As cateninas, em geral, atuam reforçando a adesão celular por meio da formação de placas protéicas que se unem firmemente ao citoesqueleto. A E-caderina, α e β cateninas, bem como a actina do citoesqueleto, são expressas e estocadas no oócito durante a oogênese e estão, portanto, presentes nos embriões mamíferos em estádios iniciais de desenvolvimento (Vestweber *et al.*, 1987). Contudo, adesões celulares estáveis, principalmente mediadas pela E-caderina, não são formadas até que seja iniciado o processo de compactação (Pauken & Capco, 1999).

Uma vez que a compactação ocorre, as células embrionárias próximas à zona pelúcida iniciam a formação de complexos de adesão adicionais, em particular junções *tight*, e também estabelecem seus sistemas de transporte de íons em preparação para a formação do blastocisto (Fleming *et al.*, 2000). O desenvolvimento do estádio de blastocisto é caracterizado pela diferenciação de células do trofotoderma, que se localizam mais externamente e circundam a blastocele, e pela formação de uma massa celular interna (MCI) (Gopichandran & Leese, 2003; Figura 3). As células do trofotoderma são polarizadas, com uma superfície apical dotada de microvilosidades e uma superfície basolateral relativamente lisa que circunda o fluido da blastocele. Em contrapartida, as células da MCI são apolares e desprovidas de microvilosidades (Pratt, 1985).

O trofotoderma atua como uma barreira seletiva para o movimento de solutos para dentro e para fora da blastocele. Em particular, a enzima $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$, localizada nas membranas apical e basolateral do trofotoderma, transporta Na^+ para o interior da cavidade da blastocele, permitindo a posterior entrada de água por processos osmóticos. A $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$ tem sido implicada como efetora primária para a formação do blastocisto por estabelecer e manter um gradiente iônico através do trofotoderma que promove um acúmulo osmótico de água no epitélio (Watson & Barcroft, 2001). Todavia, estudos mais recentes constataram que aquaporinas (AQP) ou canais de água podem atuar como importantes mediadores do movimento

de fluidos através do trofotoderma (Barcroft *et al.*, 2003), sugerindo que a enzima $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$ pode não ser um regulador indispensável para a formação da blastocele e, conseqüentemente, do estágio de blastocisto.

A formação da blastocele corresponde a um evento de grande dispêndio energético (Benos & Biggers, 1981) e, presumivelmente, tem o papel de assegurar a aposição de membranas do trofotoderma e endométrio. O desenvolvimento e diferenciação da blastocele, bem como o fenômeno de compactação embrionária, são dependentes da transcrição de genes embrionários específicos. A ativação seqüencial de tais genes proporciona um aumento no nível de biossíntese total, o qual é refletido em uma elevação na demanda de energia pelo embrião e nos seus precursores biossintéticos. Deste modo, é possível perceber que à medida que o embrião se torna mais complexo, há um concomitante aumento em suas demandas energéticas (Gardner, 1998).

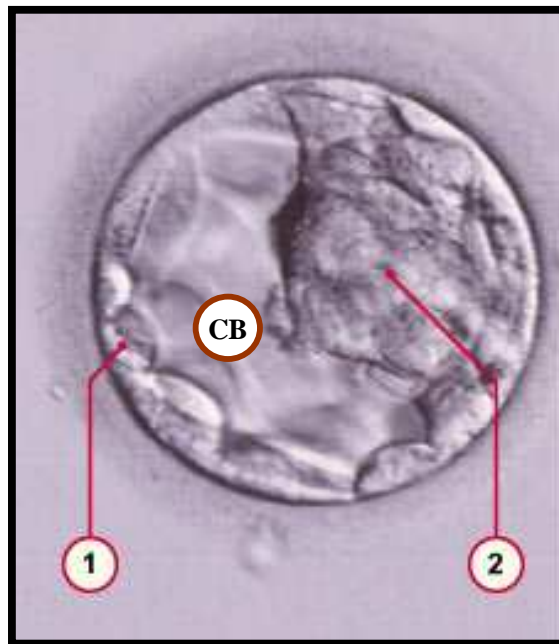


Figura 3. Embrião no estágio de blastocisto, aproximadamente no dia 5 de desenvolvimento. Nesse estágio, há a diferenciação de células do trofotoderma (1) e da massa celular interna (2), com formação de uma cavidade blastocística (CB) ou blastocele (Adaptado a partir de Laboratoire de Biologie de la Reproduction; Lausanne, www.embryology.ch).

Dentre os diferentes eventos que caracterizam o período de pré-implantação em mamíferos, a ativação do genoma embrionário pode ser considerada como um dos mais importantes. A ativação ocorre quando os transcritos expressos a partir do genoma zigótico/embrionário substituem os transcritos maternos, que passam a direcionar o desenvolvimento inicial (Figura 4). Tal evento é um processo complexo que requer uma série bastante coordenada de modificações nucleares e citoplasmáticas. Segundo Kanka (2003), as mudanças na estrutura da cromatina de embriões em estádios iniciais exercem um importante papel na ativação do genoma, porém não são suficientes para ativar a transcrição. Nesse contexto, outros estudos observaram que mudanças citoplasmáticas, especialmente disponibilidade, conteúdo ou atividade de fatores transcripcionais, atuam em conjunto com as mudanças na cromatina para o sucesso da transcrição (Latham & Schultz, 2001).

Um grande número de fatores transcripcionais é expresso como proteínas de origem materna em embriões durante o seu desenvolvimento inicial. Em camundongos, a abundância de transcritos dos fatores Sp1, TBP, CBP e mTEAD-2 começa a diminuir durante a maturação oocitária, aumentando, posteriormente, no estágio de duas células (Worrad & Schultz, 1997; Wang & Latham, 2000). Tal padrão reflete a degradação do mRNA materno, iniciada durante a maturação do oócito, e a substituição desses transcritos maternos por transcritos zigóticos após a ativação do genoma embrionário (Schultz, 1993; Davis *et al.*, 1996). Em ruminantes, a ativação do genoma ocorre por volta do estágio de 8-16 células, quando ocorrem as principais mudanças na ultra-estrutura do nucléolo do blastômero e nos padrões de síntese protéica (Memili & First, 2000).

Acredita-se que uma das funções primárias da ativação do genoma embrionário seja a prevenção da morte celular programada, ou apoptose, uma vez que o oócito apresenta informações capazes de ativar esse mecanismo de morte celular quando não fertilizado (Jurisicova, 1998; Dalbiés-Tran & Mermillod, 2003).

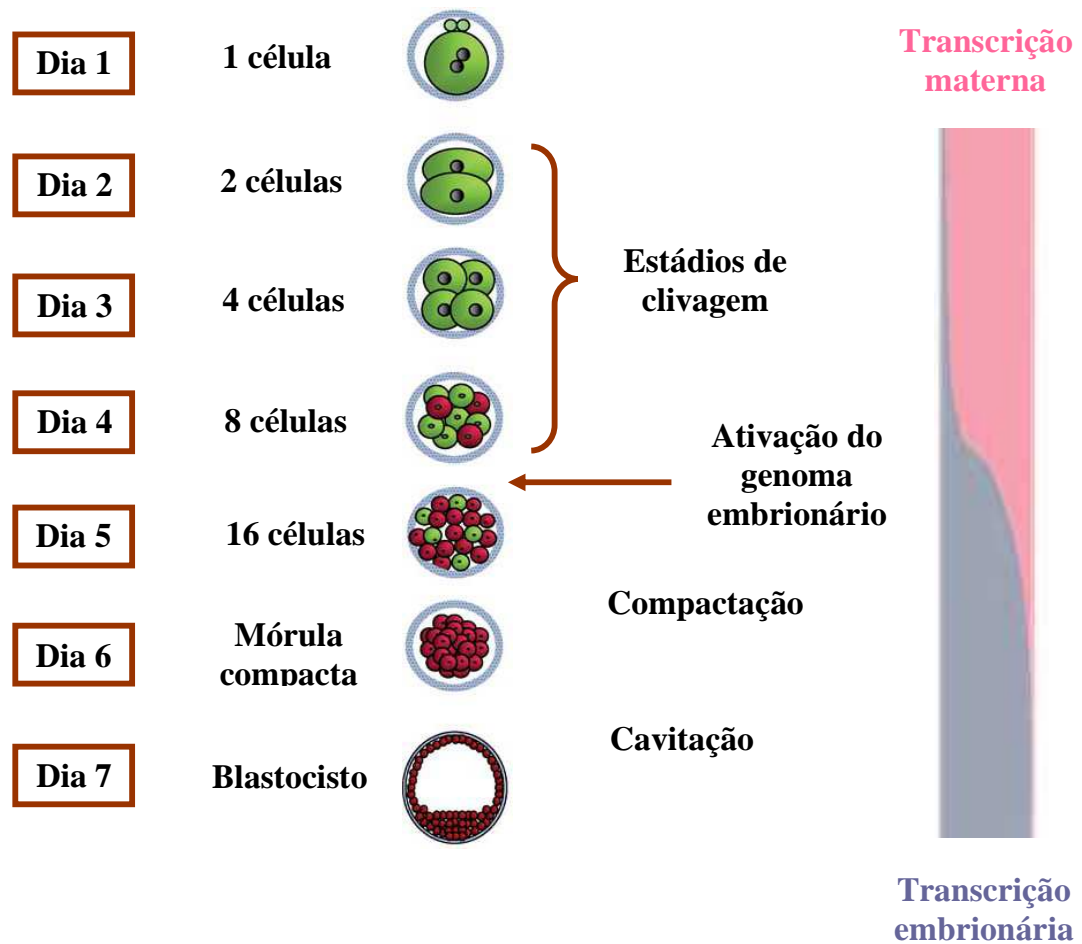


Figura 4. Ativação do genoma embrionário, caracterizada pela substituição gradual da atividade transcripcional materna pela atividade transcripcional do embrião. Em ruminantes, a ativação do genoma ocorre no estágio de 8 a 16 células, como demonstrado na figura (Adaptado de Hardy & Spanos, 2002).

2.1.2 Nutrição Histotrófica: O Papel das Secreções Uterinas

Nas espécies ovina e caprina, o conceito atinge o útero durante a primeira semana de gestação, e permanece livre ou pouco aderido ao lúmen uterino até a implantação, a qual ocorre durante a quarta semana de gestação. Antes da implantação, os conceptos são nutridos apenas por secreções presentes na luz do útero, um fenômeno comumente conhecido como nutrição histotrófica. A nutrição histotrófica corresponde à primeira fonte nutricional disponível para o desenvolvimento do conceito e parece ser essencial para sua sobrevivência e crescimento durante a gestação em animais domésticos (Spencer *et al.*, 2004). Em ruminantes, o embrião é completamente dependente da nutrição histotrófica por um período prolongado de seu desenvolvimento, em relação a outras espécies de mamíferos, visto que os embriões de ruminantes não sofrem completa adesão ao lúmen uterino até que a organogênese inicial ocorra (Thompson, 2006).

As secreções uterinas, denominadas de histótrofos, são misturas complexas de enzimas, fatores de crescimento, citocinas, linfocinas, hormônios, proteínas de transporte e outras substâncias (Bazer, 1975). Gases e pequenas moléculas de nutrientes, como açúcares e aminoácidos, parecem alcançar a superfície absorptiva do trofotoderma por difusão através dos fluidos luminiais. Embora os requerimentos nutricionais específicos para o desenvolvimento do embrião não estejam ainda bem estabelecidos, dados indicam que, em embriões ovinos, há uma diminuição na produção de energia derivada do metabolismo da glicose pelo trofoblasto, entre os dias 13 e 19 (Wales & Waugh, 1993), enquanto observa-se um significativo aumento no metabolismo do acetato pelos tecidos do trofoblasto durante esse período (Waugh & Wales, 1993).

Muitos dos conhecimentos sobre nutrição histotrófica foram derivados de uma avaliação dos produtos secretórios do endométrio e do conceito. Por exemplo, a proteína de ligação do retinol é o principal produto secretório do conceito (Trout *et al.*, 1991) e endométrio ovino (Harney *et al.*, 1993) durante o período de pré-implantação. Tal proteína é conhecida por apresentar importantes funções no transporte da vitamina A lipossolúvel (retinol) para o interior do embrião em desenvolvimento. Os retinóides possuem numerosos efeitos sobre a função celular e tecidual e são necessários para o desenvolvimento embrionário e diferenciação de membranas extra-embrionárias. Contudo, se presentes em quantidades excessivas, tornam-se prejudiciais à função e estrutura da membrana.

Outro importante grupo de proteínas secretórias que regem a comunicação concepto-maternal em ovinos são os fatores de crescimento, particularmente aqueles pertencentes à família dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs). Acredita-se que tais fatores derivados do útero regulam o crescimento do concepto por uma via parácrina, envolvendo a ligação com receptores específicos do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e com proteínas de ligação do IGF. Em ovinos, o IGF-I e o IGF-II estão presentes nos fluidos uterinos entre os dias 10 e 16 (Ko *et al.*, 1991), com maiores níveis de IGF-I nas ovelhas cíclicas do que nas prenhes no dia 16. Estudos posteriores têm demonstrado a expressão de genes para o IGF-I, IGF-II e fator de crescimento transformador α (TGF α) em embriões ovinos no período de pré-implantação (Watson *et al.*, 1994), ressaltando a natureza complexa das interações entre o concepto e os fatores de crescimento uterinos durante o estabelecimento da gestação.

Estudos realizados em humanos, primatas e subprimatas evidenciaram o importante papel das secreções endometriais como reguladores primários do desenvolvimento e sobrevivência do concepto, produção de sinais de reconhecimento materno da gestação, implantação e placentação (Gray *et al.*, 2001a; Burton *et al.*, 2002). De acordo com Guillomot *et al.* (1981), as células epiteliais com microvilosidades que revestem o lúmen uterino apresentam uma alta atividade secretória durante a fase luteal do ciclo e ao início da implantação. O trofocotoderma, por sua vez, demonstra atuar como um local de intensa atividade pinocítica, a qual aumenta à medida que o blastocisto se desenvolve (Wintenberger-Torres & Flechon, 1974). Deste modo, tem-se hipotetizado que importantes metabólitos necessários para o crescimento do concepto são obtidos a partir dos histótrofos uterinos. Esta hipótese é fundamentada, ainda, em estudos sobre transferências assíncronas de embriões e vesículas trofoblásticas (Flechon *et al.*, 1986), e, principalmente, em resultados obtidos a partir da utilização de ovelhas submetidas à inibição do desenvolvimento glandular uterino (Gray *et al.*, 2001b, 2002).

Em ovinos, a exposição contínua do útero à progesterona durante a gestação induz a expressão de proteínas nas glândulas endometriais que passam a ser secretadas no lúmen uterino. Dentre essas substâncias, destacam-se as proteínas do leite uterino ovino (UTMPs) e as osteopontinas (OPNs). As UTMPs são membros da família serpina de inibidores de protease (Peltier & Hansen, 2001) e, juntamente com as OPNs, importantes glicoproteínas, funcionam como excelentes marcadores da capacidade secretória endometrial durante a gestação em ovelhas (Spencer *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2000). Contudo, tais proteínas só apresentam-se em níveis

abundantes no lúmen uterino a partir do período peri-implantacional, alcançando maiores concentrações à medida que se estabelece o crescimento e desenvolvimento fetal (Stewart *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2003).

2.1.3 Metabolismo como Regulador-Chave do Desenvolvimento Embrionário

Nos embriões de ruminantes, o ambiente energético que determina as vias metabólicas para a geração de ATP e substratos anabólicos se encontra provavelmente implicado na determinação da competência de desenvolvimento embrionário (Thompson, 1996). Associado a isso, estudos têm demonstrado que a disponibilidade de substratos energéticos, especialmente glicose e oxigênio, alteram a capacidade de desenvolvimento do embrião (Kim *et al.*, 1993; Lim *et al.*, 1999).

Em mamíferos, o metabolismo embrionário de pré-implantação é caracterizado por um aumento marcante na produção de ATP no estágio de blastocisto (Leese, 1995). Por exemplo, o consumo de oxigênio, principal rota pela qual o ATP é gerado durante o desenvolvimento de pré-implantação, aumenta 2,7 e 2,25 vezes entre os estádios de mórula e blastocisto em fêmeas de camundongos e em vacas, respectivamente (Houghton *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1996). De modo similar, a produção de ATP calculada a partir do consumo de oxigênio e glicólise (a conversão de glicose para lactato) aumenta em aproximadamente 3 e 1,7 vezes, no mesmo período, também em embriões de camundongos e bovinos. Os dois principais consumidores de ATP em células somáticas de mamíferos são a bomba de íons, via enzima $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$ (bomba de sódio e potássio; Leese, 1995), e a síntese protéica (Thompson *et al.*, 1998). Visto que um aumento final no conteúdo protéico somente ocorre após a formação do blastocisto (Sellens *et al.*, 1981), é provável que o aumento requerido para o ATP em tal estágio seja amplamente em função da $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$.

Mudanças significativas ocorrem nas atividades das vias geradoras de energia (glicólise e fosforilação oxidativa) durante o desenvolvimento embrionário do estágio de zigoto até blastocisto. Durante o desenvolvimento do blastocisto, a geração de ATP, anteriormente dependente do processo de fosforilação oxidativa, passa ser realizada preferencialmente pela via glicolítica (Leese, 1995). Tal mudança provavelmente está associada a uma redução nos requerimentos de fosforilação oxidativa mitocondriais neste período, visto que estudos

posteriores demonstraram que o estágio de desenvolvimento embrionário pós-compactação parece se beneficiar de uma diminuição na fosforilação oxidativa durante o cultivo *in vitro* (Thompson *et al.*, 2000; Harvey *et al.*, 2004).

Os requerimentos dos embriões durante o desenvolvimento de pré-implantação variam de acordo com o estágio embrionário e dependem da disponibilidade de substratos presentes no ambiente circundante (Thompson, 1996). Em embriões bovinos, os estádios iniciais de desenvolvimento apresentam uma limitada capacidade de utilizar glicose até a compactação, dependendo principalmente, da oxidação de nutrientes como piruvato e aminoácidos para fornecimento de energia (Thompson *et al.*, 1996). Contudo, como observado em outras espécies (Leese, 1995; Harvey, 2007), há um aumento no consumo de glicose e produção de lactato no momento da compactação (Thompson *et al.*, 1996), o qual coincide com a transição do embrião do oviduto para o útero.

A mudança no uso da glicose como substrato energético primário parece ser decorrente de modificações biossintéticas e de desenvolvimento relativas à formação do fluido da blastocela e à preparação para o processo de implantação. Tal mudança na preferência de utilização de glicose pelo embrião coincide com uma máxima expressão de cinco importantes membros da família dos transportadores de glicose facilitadores, os GLUTs. O GLUT1 é expresso no oócito e durante todo o desenvolvimento embrionário (Pantaleon *et al.*, 1997a). Os GLUT2, GLUT3 e GLUT5 são ativados no estágio embrionário de oito células, enquanto o GLUT8 é detectado apenas no estágio de blastocisto (Carayannopoulos *et al.*, 2000). Além destes, dois novos transportadores de glicose têm sido recentemente identificados em embriões durante a pré-implantação: o GLUT9 e o GLUT12 (Riley & Moley, 2006). Ambos são expressos a partir de estádios embrionários iniciais (1 a 2 células) e também têm sido implicados no aumento gradual do consumo de glicose pelo embrião, necessário para a manutenção de sua vitalidade.

Estudos têm demonstrado que uma diminuição significativa no transporte de glicose em blastocistos, induzida pela diabetes materna, ocorre concomitantemente a um aumento prematuro e exagerado na apoptose embrionária (Moley *et al.*, 1998). Similarmente, Pinto *et al.* (2002) relataram que uma diminuição no consumo de glicose via GLUT8, estimulada por níveis elevados de insulina e IGF-I, causa um aumento da apoptose no estágio de blastocisto e uma redução no sucesso da gestação. Estes dados indicam que os complexos mecanismos de

transporte da glicose e a manutenção de concentrações ótimas de glicose intra-embrionárias são requeridos para o desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de pré-implantação (Carayannopoulos *et al.*, 2004).

Além da glicose, outros substratos exercem importante papel no metabolismo embrionário, dentre eles aminoácidos e oxigênio. Um estudo inicial enfocando os efeitos benéficos de aminoácidos no desenvolvimento de embriões, durante o período de pré-implantação, foi realizado por Gwatkin (1966), o qual observou que a presença de aminoácidos no meio de cultivo estimulou a posterior implantação e crescimento de blastocistos de camundongos. Tal estudo *in vitro*, bem como estudos posteriores, suportaram a idéia de que os aminoácidos atuam especificamente nos estádios posteriores ao desenvolvimento embrionário pré-implantacional. Contudo, a inclusão de aminoácidos no meio de cultivo para zigotos e embriões em estágio de clivagem também pode ser considerada viável, quando se considera que os fluidos ovidutários e uterinos contêm uma significativa quantidade de aminoácidos livres (Moses *et al.*, 1997). Atualmente, aminoácidos são adicionados ao meio de cultivo de embriões bovinos em estádios iniciais, atuando sobre um grande número de funções, dentre elas síntese protéica (Epstein & Smith, 1973), fornecimento de energia (Partridge & Leese, 1996; Jung *et al.*, 1998), osmorregulação (Baltz, 2001), regulação do pH (Baltz, 1993; Edwards *et al.*, 1998), proteção contra estresse oxidativo (Lindenbaum, 1973) e remoção de amônia (Partridge & Leese, 1996; Donnay & Leese, 1999).

O oxigênio também é um importante componente dos ambientes ovidutário e uterino, podendo exercer, portanto, importante papel no controle do desenvolvimento embrionário, particularmente através da regulação do metabolismo. Segundo Harvey (2007), os embriões parecem encontrar um gradiente decrescente de concentração de oxigênio à medida que estes progridem do oviduto para o útero. De fato, durante o momento da implantação inicial, condições de hipóxia ou mesmo anóxia são aplicadas ao trofotoderma durante sua adesão ao lúmen uterino (Leese, 1995). Acredita-se, deste modo, que esse gradiente de oxigênio exerça uma importante função regulatória na programação do desenvolvimento embrionário normal *in vivo*. No entanto, os efeitos das concentrações de oxigênio sobre a atividade metabólica do embrião, e sobre seu subsequente desenvolvimento, ainda não foram completamente elucidados, demandando maiores estudos (Thompson *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 2005).

2.2 Sobrevivência Embrionária e Fertilidade em Ruminantes

2.2.1 Reconhecimento Materno da Gestação e Sobrevivência Embrionária

O reconhecimento materno da gestação em ruminantes ocorre através da ação de uma proteína produzida pelas células trofoblásticas embrionárias, denominada de Interferon *tau* (IFN- τ). O IFN- τ é secretado em grandes quantidades pelo embrião entre os dias 15 e 17 da gestação (Santos *et al.*, 2004), com início de produção no dia 12, e possui um importante efeito anti-luteolítico, atuando por meio da inibição ou alteração nos padrões de secreção endometrial de prostaglandina F2 α (PGF2 α ; Ealy *et al.*, 2004). Tal efeito é obtido através do bloqueio da expressão de receptores de oxitocina no endométrio, o qual determina o impedimento da ação da oxitocina luteal e hipofisária no estímulo para a síntese e liberação de PGF2 α endometrial (Demmers *et al.*, 2001). Em ovinos, o IFN- τ limita indiretamente a expressão do gene do receptor de oxitocina, por meio da inibição da expressão do receptor de estrógeno no epitélio endometrial (Fleming *et al.*, 2001). Contudo, em bovinos, a expressão gênica do receptor de oxitocina parece sofrer uma regulação direta do IFN- τ (Robinson *et al.*, 1999). O IFN- τ também tem o papel de estimular a produção de prostaglandina E₂, um importante agente luteotrófico, e aumentar a produção de diversas proteínas secretórias de origem uterina que podem estar envolvidas na manutenção da viabilidade do conceito (Ott *et al.*, 1998; Nagaoka *et al.*, 2003).

O efeito anti-luteolítico do IFN- τ resulta em manutenção de um corpo lúteo funcional, com conseqüente secreção de níveis plasmáticos constantes de progesterona, essenciais para a obtenção de um ambiente uterino adequado para o desenvolvimento a termo do embrião (Spencer *et al.*, 2004). Além desta função, o IFN- τ desempenha uma potente atividade anti-viral e anti-proliferativa (Pontzer *et al.*, 1988; Pontzer *et al.*, 1991), que contribui para a manutenção da gestação. Em vista do importante papel do IFN- τ , pesquisas recentes têm buscado determinar quais fatores podem estar envolvidos na manutenção do corpo lúteo e, portanto, da gestação após o declínio nos níveis desta proteína. Silva *et al.* (2000) observaram que o corpo lúteo que é mantido durante o reconhecimento materno da gestação é capaz de degradar PGF2 α em seu metabólito (PGFM). Os mesmos autores demonstraram ainda que, no dia 13 de gestação, os corpos lúteos de ovelhas com embriões viáveis tiveram maior concentração e atividade da prostaglandina desidrogenase (PGDH), em relação aos corpos lúteos de ovelhas cíclicas no dia 13 da fase luteal. Tal achado sugere um envolvimento do corpo lúteo na inibição dos efeitos da

PGF2 α e, conseqüentemente, na manutenção gestacional durante e provavelmente após o reconhecimento materno da gestação.

Um atraso no desenvolvimento do conceito pode resultar em perda embrionária (Wilmut & Sales, 1981). Tal perda pode ser devido a uma inabilidade do embrião em sinalizar sua presença ao organismo materno no momento de prevenir a luteólise. Assim, embora fatores ambientais, como o estresse calórico, possam afetar a sobrevivência embrionária, acredita-se que a principal causa esteja relacionada a um desenvolvimento retardado do embrião e/ou a uma falha em produzir quantidades suficientes de IFN- τ para prevenir o processo luteolítico (Goff, 2002). É importante ressaltar que a quantidade de IFN- τ sintetizada pelo conceito sofre influência do estágio de desenvolvimento do embrião, podendo, ainda, ser usada como um indicador objetivo da qualidade embrionária, visto que fornece uma medida direta da atividade biossintética do trofoblasto (Hernandez-Ledezma *et al.*, 1993).

Os padrões de desenvolvimento folicular e a resultante secreção de 17 β -estradiol durante o dia 14 ao dia 17 pós-cobertura parecem ser importantes em relação à sobrevivência embrionária durante o reconhecimento materno da gestação. Tal conceito foi originalmente apresentado por Macmillan *et al.* (1986) e tem sido suportado em subseqüentes estudos por Thatcher *et al.* (1989) e outros autores, nos quais a ovulação ou atresia do folículo dominante durante a metade da fase luteal aumentaram, em alguns casos, a taxa de gestação.

Evidências da associação da perda embrionária com secreção excessiva de estrógeno durante o reconhecimento da gestação foram obtidas em vacas de corte por Pritchard *et al.* (1994). Neste estudo, amostras de sangue foram colhidas de 100 vacas de corte lactantes para mensurar os níveis plasmáticos de progesterona e estradiol durante os dias 14 a 17 pós-cobertura. As fêmeas foram divididas em três grupos de acordo com as concentrações de 17 β -estradiol no quarto dia de colheita: os grupos baixo (1,6 pg/mL), médio (2,1 pg/mL) e alto (3,1 pg/mL). Pôde-se constatar, a partir deste estudo, que há um declínio na taxa de concepção ao primeiro serviço (77, 60 e 42%, respectivamente), à medida que a concentração de estradiol sofre um aumento em seus níveis plasmáticos.

Está claro que, em alguns casos, existe uma associação da perda embrionária durante o reconhecimento materno da gestação com maiores concentrações circulantes de estrógeno. Contudo, o momento exato de um efeito estrogênico e o mecanismo pelo qual o estrógeno pode

interferir com o desenvolvimento embrionário ainda não estão completamente estabelecidos (Inskeep, 2004).

2.2.2 Prostaglandina F2 α e Seu Papel Embriotóxico

Concentrações endometriais de prostaglandina F2 α (PGF2 α) podem sofrer um aumento ocasionado por vários fatores estressantes, como subnutrição (Butler, 1998) e estresse calórico (Malayer *et al.*, 1990), e, quando elevadas prematuramente, são associadas com morte embrionária precoce. O momento aparente da perda embrionária, em torno do dia 5 ao dia 8 da gestação, mostrou-se concomitante ao aumento da secreção uterina de PGF2 α no dia 4 ao dia 9 pós-estro em vacas com fases luteais curtas (Cooper *et al.*, 1991). Nesse contexto, Schrick *et al.* (1993) observaram que as concentrações de PGF2 α nos lavados uterinos de vacas com fases luteais curtas foram maiores que o dobro das concentrações deste hormônio em vacas com fases luteais normais (636 ± 82 e 288 ± 90 pg/mL, respectivamente). Além disso, as concentrações de PGF2 α nos lavados uterinos tenderam a ser correlacionadas negativamente com a qualidade embrionária ($r = -0,42$).

Um efeito embriotóxico direto da PGF2 α tem sido sugerido para embriões de camundongos (Harper & Skarnes, 1972) e demonstrado em embriões de coelhos (Maurer & Beier, 1976) e ratos (Breuel *et al.*, 1993). Recentemente, Scenna *et al.* (2004) realizaram um estudo com embriões bovinos a fim de verificar os efeitos da PGF2 α sobre o seu desenvolvimento pré- e pós-compactação. Neste estudo, os embriões foram submetidos a cultivos *in vitro* com diferentes concentrações de PGF2 α , sendo posteriormente avaliados quanto ao seu estágio de desenvolvimento. Os resultados obtidos revelaram que a adição de PGF2 α no meio de cultivo, independente da concentração utilizada, reduz o desenvolvimento de embriões pré-compactados até o estágio de blastocisto, sem reduzir, contudo, o desenvolvimento de mórulas compactas até tal estágio. As mórulas compactas, embora não prejudicadas quanto ao seu desenvolvimento, apresentaram menores taxas de eclosão quando inicialmente cultivadas com PGF2 α . Tais resultados reforçam o efeito negativo direto da PGF2 α sobre o desenvolvimento embrionário e, conseqüentemente, sobre a qualidade e viabilidade dos embriões.

Buford *et al.* (1996) demonstraram que a PGF2 α foi prejudicial aos embriões quando administrada em vacas de corte com ciclos normais, durante o dia 4 ao dia 7 após o estro e inseminação, sendo este um intervalo similar ao período no qual uma alta mortalidade embrionária tem sido observada em vacas com fases luteais curtas. Os mesmos autores testaram, ainda, se a sobrevivência embrionária em vacas desmamadas precocemente foi melhorada quando o efeito luteolítico da PGF2 α foi reduzido pelo tratamento com flunixin meglumine, um inibidor da prostaglandina G/H sintetase (PGHS). Os resultados do estudo indicaram que a taxa de gestação sofreu um aumento apenas quando o flunixin meglumine foi combinado com a remoção do corpo lúteo, demonstrando, portanto, que o corpo lúteo em regressão parece ser um componente do efeito embriotóxico da PGF2 α . Deste modo, torna-se possível que mesmo concentrações subluteolíticas de PGF2 α de origem uterina (Schramm *et al.*, 1983) exerçam um importante papel sobre a perda embrionária, durante o desenvolvimento inicial, devido à liberação concomitante de PGF2 α pelo corpo lúteo.

Para confirmar tal achado, Hernandez-Fonseca *et al.* (2000) transferiram um embrião para cada corno uterino, a fim de testar se níveis significativos de PGF2 α seriam liberados localmente para o corno uterino adjacente ao corpo lúteo em regressão. A redução da sobrevivência embrionária não diferiu entre os cornos uterinos ipsi e contralateral ao corpo lúteo, podendo-se verificar, portanto, que o efeito observado foi de origem sistêmica ou através do lúmen uterino.

Em geral, considera-se a evidência de que elevadas concentrações de PGF2 α são tóxicas para embriões de ruminantes em estádios iniciais de desenvolvimento. Dados mais recentes suportam o conceito de que o efeito é direto e não requer transferência local do ovário para o útero, mas que um corpo lúteo em regressão pode ser uma fonte significativa da PGF2 α envolvida no efeito embriotóxico (Inskeep, 2004).

2.2.3 Progesterona e Sobrevivência Embrionária

A secreção luteal de progesterona é essencial para o sucesso da gestação, ovulação de um ócito de boa qualidade, manutenção da quiescência uterina, nutrição e sobrevivência embrionária e fetal, bem como para ocorrência de partos normais (McDonald *et al.*, 1952).

Nesse contexto, estudos de Meisterling & Dailey (1987) registraram uma fertilidade reduzida em vacas leiteiras associada com baixas concentrações de progesterona durante o ciclo estral precedente à inseminação artificial. Sabe-se, todavia, que existe um grande número de mecanismos potenciais pelos quais baixas concentrações de progesterona podem reduzir a fertilização e/ou as taxas de sobrevivência embrionária. Como exemplo, baixos níveis plasmáticos deste hormônio resultam em persistência de folículos dominantes que produzem oócitos em um estágio mais avançado de maturação, em relação à folículos dominantes de idade e tamanho normais (Mihm *et al.*, 1999). Em virtude disso, oócitos oriundos de folículos dominantes persistentes são, apesar de fertilizáveis, suscetíveis à morte embrionária precoce (Austin *et al.*, 1999).

Associado à redução nas concentrações periféricas de progesterona, verifica-se 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). Contudo, como descrito previamente, a evidência de uma associação negativa entre elevadas concentrações periféricas de estradiol no período peri-ovulatório e subsequente sobrevivência embrionária ainda é pouco conclusiva (Inskeep, 2004). Há também indícios de que baixas concentrações de progesterona antes do estro podem influenciar a morfologia endometrial durante o ciclo subsequente, como evidenciado por um aumento na secreção de $\text{PGF}2\alpha$ após desafio com oxitocina (Shaham-Abalancy *et al.*, 2001), que resultou em um efeito potencialmente embriotóxico.

Em novilhas de corte, Diskin *et al.* (2004) demonstraram que há uma associação linear e quadrática entre concentrações periféricas de progesterona e sobrevivência embrionária. Tais dados recentes obtidos em bovinos estão de acordo com os resultados de estudos anteriores em ovinos (Parr *et al.*, 1987) e suínos (Jindal *et al.*, 1996), nos quais foi observada, ainda, uma relação inversa entre concentrações circulantes de progesterona e ingestão alimentar. Além disso, há evidências para ovinos (Parr *et al.*, 1987), suínos (Ashworth, 1991) e vacas leiteiras (Starbuck *et al.*, 2001) de que uma suplementação com progesterona naqueles animais com baixas taxas de

sobrevivência embrionária, como resultado de uma insuficiência deste hormônio, reduziria o risco de perdas.

Uma análise de diversos estudos utilizando suplementação com progesterona mostrou um aumento total de 5,2% na taxa de gestação após o tratamento tardio com esse hormônio (a partir da primeira semana pós-fertilização), comparado a um aumento de 10,3% nos estudos onde a progesterona foi administrada antes do dia 6 da gestação. Garrett *et al.* (1988) constataram, ainda, que uma suplementação com progesterona realizada precocemente (entre os dias 2 e 5) aumenta a taxa de desenvolvimento do concepto, o qual pode vir a sofrer um aumento de até dez vezes em seu tamanho no dia 14. No entanto, a administração de progesterona exógena traz a desvantagem de ocasionar uma possível redução na secreção de gonadotrofinas hipofisárias, das quais o corpo lúteo é dependente. Embora tal efeito não seja significativo enquanto a progesterona está sendo administrada, pode vir a se tornar prejudicial ao término do tratamento se o corpo lúteo tiver sofrido redução em seu tamanho ou em sua capacidade secretória durante o período de administração (Royal *et al.*, 2000).

Evidências indicam que a progesterona exerce um importante papel na regulação de secreções uterinas essenciais para o desenvolvimento embrionário inicial, tais como proteínas e fatores de crescimento. Tal achado foi verificado por Ashworth *et al.* (1985), onde ovelhas ovariectomizadas que receberam implantes de esteróides a longo prazo, no intuito de mimetizar mudanças em hormônios endógenos durante a gestação inicial, demonstraram que diversas proteínas específicas do fluido uterino foram estimuladas pela progesterona. Também tem sido observado que a sincronia entre o embrião e o endométrio é regulada pelo momento em que há uma elevação pós-ovulatória nos níveis plasmáticos de progesterona. Neste sentido, um estudo de Mann & Lamming (2001) demonstrou que em um grupo de vacas com embriões de dia 16, aquelas que apresentaram embriões de pobre desenvolvimento haviam sofrido um atraso no aumento de progesterona após a ovulação, quando comparadas às vacas com embriões de desenvolvimento normal.

Embora o momento da elevação de progesterona seja importante para o desenvolvimento embrionário, a concentração deste hormônio também se mostra indispensável para prevenir a luteólise e, portanto, manter a gestação. Experimentos com vacas ovariectomizadas e tratadas com progesterona demonstraram que uma baixa concentração plasmática deste hormônio resulta no desenvolvimento de um forte sinal luteolítico (Mann &

Lamming, 1995). Outros estudos demonstraram, ainda, que a produção de IFN- τ pelo concepto é positivamente correlacionada com a concentração de progesterona plasmática materna (Kerbler *et al.*, 1997). Estes achados evidenciam que baixos níveis plasmáticos de progesterona podem influenciar o desenvolvimento embrionário, presumivelmente por causar uma alteração nas secreções endometriais, a qual resulta em redução na secreção de IFN- τ . Deste modo, em vacas com baixas concentrações de progesterona durante a gestação inicial, o embrião tende a secretar menos IFN- τ , tornando-se mais difícil para esta proteína prevenir a secreção de PGF2 α . Tais observações confirmam, portanto, que uma redução nas concentrações plasmáticas de progesterona pode retardar a taxa de crescimento e desenvolvimento dos embriões, bem como a sua taxa de sobrevivência (Sreenan *et al.*, 2001).

2.2.4 Interações entre Estado Nutricional, Concentrações de Progesterona e Sobrevivência Embrionária

Rhind *et al.* (1985) sugeriram que a complexa relação entre nutrição e sobrevivência/crescimento embrionário em ovinos depende das interações entre o genótipo, fecundidade, grau e duração da restrição alimentar. Nesta espécie, é bem documentado que há uma relação inversa entre estado nutricional pós-monta e concentrações periféricas de progesterona (Williams & Cumming, 1982), sendo baixas concentrações deste hormônio, após um elevado plano alimentar, associadas com uma elevada taxa de perda embrionária. Acredita-se que essa relação reflete uma elevação no metabolismo da progesterona a partir de um aumento na ingestão alimentar.

Baixos níveis circulantes de progesterona podem ocorrer devido à redução de sua secreção pelo corpo lúteo ou à um aumento no metabolismo da progesterona secretada. É de conhecimento que o fígado é o maior local de metabolismo de esteróides do organismo. Assim, mudanças na ingestão de nutrientes poderiam influenciar o metabolismo da progesterona por meio de pelo menos três vias: mudanças na massa hepática, alterações na taxa de fluxo sanguíneo através do fígado e modificações na atividade da oxidase ou enzimas do P-450 hepático que catalisam esteróides. Ressalta-se, contudo, que estes três mecanismos não possuem, necessariamente, ação mútua (Ashworth, 1995).

A progesterona é rapidamente metabolizada pelo fígado e os metabólitos são excretados na bile e eliminados nas fezes (Palme *et al.*, 1996). Dados mais recentes têm demonstrado que mudanças no nível de progesterona fecal refletem os perfis deste hormônio no leite e no plasma, refletindo, portanto, a função luteal e/ou placentária (Schwarzenberger *et al.*, 1997). Assim, a análise dos metabólitos de progesterona presentes nas fezes tem surgido como um importante método para monitorar as taxas metabólicas deste hormônio esteróide, com resultados mais concretos já tendo sido obtidos na espécie bovina (Rabiee *et al.*, 2001a, 2002a).

Vacas em melhores condições corporais tendem a ingerir maiores quantidades de alimento, o que resultaria em um aumento no metabolismo da progesterona e, conseqüentemente, em menores concentrações plasmáticas deste hormônio (Rabiee *et al.*, 2002b). Nestes animais, um plano nutricional elevado e contínuo parece aumentar cronicamente o fluxo sanguíneo hepático e, assim, as taxas metabólicas dos hormônios esteróides. Todavia, em vacas em lactação, tais alterações hepáticas e metabólicas têm se mostrado duas vezes maiores em relação à vacas não lactantes, o que indica que mesmo com um nível similar de produção hormonal, as concentrações dos hormônios esteróides poderiam ser inferiores em vacas durante o período lactacional (Sangsritavong *et al.*, 2002).

De fato, o aumento na produção de leite é acompanhado por um aumento concomitante no metabolismo da progesterona, o que está diretamente relacionado a um incremento nas demandas nutricionais (Bech-Sàbat *et al.*, 2008). Neste sentido, em um experimento envolvendo suplementação contínua com progesterona em vacas leiteiras, foi observada uma alteração nas concentrações circulantes deste hormônio e na excreção de seus metabólitos durante o período de lactação, devido a um conseqüente aumento no consumo alimentar neste período (Rabiee *et al.*, 2001b). Segundo Wiltbank *et al.* (2006), a elevação no metabolismo da progesterona, determinada por um aumento no consumo alimentar, poderia alterar a eficiência reprodutiva de diversas espécies, tendo maiores efeitos, contudo, naquelas com aumentos extremos no consumo, como vacas leiteiras em lactação. Desta forma, tais autores sugerem que algumas das alterações reprodutivas nestes animais, como elevadas taxas de perda embrionária, sejam causadas por aumentos dramáticos no metabolismo da progesterona, ocasionados por uma elevação no consumo de alimentos e fluxo sanguíneo hepático (Figura 5).

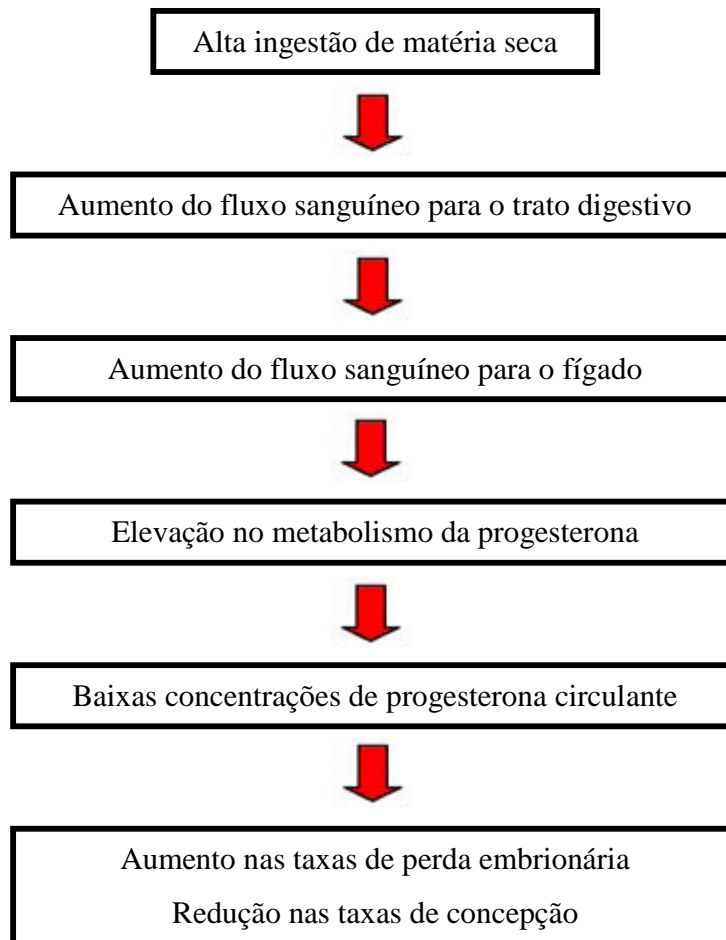


Figura 5. Via fisiológica desencadeadora de possíveis alterações reprodutivas nas diferentes espécies domésticas, observada principalmente em vacas leiteiras durante o período de lactação (Adaptado de Wiltbank *et al.*, 2006).

Parr (1992) relatou, em ovinos, que o aumento na ingestão alimentar durante o início da gestação também ocasiona uma elevação no fluxo sanguíneo hepático e, ainda, no fluxo do trato gastrintestinal. Como acima de 95% da progesterona circulante é metabolizada durante apenas uma passagem através do fígado e intestino, tal rota resulta em uma freqüente redução na concentração plasmática deste hormônio. Comparações da função luteal em ovelhas prenhes, consumindo rações em níveis acima ou abaixo dos requerimentos de manutenção, mostraram ausência de diferenças na massa luteal (Wallace *et al.*, 1994) ou na secreção de progesterona (Abecia *et al.*, 1994) a partir de corpos lúteos nos dias 16 e 14, respectivamente. Tais resultados

sugerem que os corpos lúteos não são capazes de alterar a secreção de progesterona para manter as concentrações periféricas deste hormônio constantes.

Também foi verificado em ovelhas que um 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, foi observado neste estudo que, após a ovulação, os elevados planos alimentares podem ocasionar uma supressão das concentrações plasmáticas de progesterona para níveis que comprometam a sobrevivência embrionária. Deste modo, uma oferta alimentar dentro dos padrões de manutenção tem sido considerada ótima para a sobrevivência embrionária, particularmente na espécie ovina (Robinson *et al.*, 2002).

2.2.5 Hormônios Metabólicos e Fatores de Crescimento Envolvidos no Desenvolvimento e Sobrevivência Embrionários

Nos últimos anos, diversas pesquisas na área de reprodução têm buscado elucidar os complexos mecanismos que regem as várias etapas do desenvolvimento embrionário. Os resultados obtidos até o presente momento destacam o importante papel dos hormônios metabólicos e fatores de crescimento na concretização de muitas destas etapas, de modo a se constituírem como elementos fundamentais para garantir a sobrevivência do embrião e o subsequente crescimento fetal (Hardy & Spanos, 2002).

Um hormônio metabólico que tem sido implicado como importante regulador do desenvolvimento embrionário é o hormônio do crescimento (GH) (Waters & Kaye, 2002). RNAs mensageiros (mRNAs) dos receptores de GH já foram detectados em uma grande variedade de tecidos embrionários/fetais e placentários, tais como células-tronco embrionárias de camundongos (Ohlsson *et al.*, 1993), embriões de ovinos aos 51 dias (Klempt *et al.*, 1993), incluindo seus trofocodermas e sincícios (Lacroix *et al.*, 1999), e fetos e placentas de ratos (Garcia-Aragon *et al.*, 1992). Além disso, também foi verificada a expressão de receptores de GH em zigotos de camundongos, com a presença dos mesmos persistindo ao longo de todo o desenvolvimento embrionário durante o período de pré-implantação (Terada *et al.*, 1996; Pantaleon *et al.*, 1997b).

O mRNA do GH aparece inicialmente no estágio de mórula e o hormônio, após o processo de tradução, fica localizado nas membranas celulares apicais, ou externamente a estas, e nas vesículas citoplasmáticas das células trofoblásticas do blastocisto. De acordo com Pantaleon *et al.* (1997b), o GH exógeno acelera o transporte de glicose e a síntese protéica de uma maneira dose-dependente, alcançando o efeito máximo, para o GH bovino, na dose de 0,1 ng/mL.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que a suplementação com GH aumenta o número de células nos blastocistos de camundongos (Fukaya *et al.*, 1998), bem como a taxa de formação de blastocistos (Montag *et al.*, 2000). Em bovinos, o receptor de GH é expresso a partir do dia 2 do desenvolvimento embrionário, enquanto o GH inicia sua expressão a partir do dia 8 (Izadyar *et al.*, 2000; Kolle *et al.*, 2001). Nesta espécie, o GH causa um aumento no metabolismo de lipídios e de glicogênio nos blastocistos (Kolle *et al.*, 2001) e aumenta o número de células no trofocotoderma e na massa celular interna (MCI), o que ocorre aparentemente por uma inibição do processo apoptótico (Kolle *et al.*, 2002). Outros estudos realizados em humanos demonstraram, ainda, que em embriões produzidos *in vitro*, as taxas de fertilização e clivagem e o desenvolvimento embrionário pré-implantacional estão correlacionados com a concentração de GH no fluido folicular (Mendoza *et al.*, 1999). Tais dados indicam que o GH pode, de fato, atuar como um importante modulador do desenvolvimento embrionário durante a pré-implantação. Contudo, há ainda poucas informações a respeito do modo de atuação deste hormônio e dos efeitos concretos de sua participação neste processo.

Embriões no período de pré-implantação expressam um grande número de fatores de crescimento, bem como receptores destes fatores, que têm se mostrado essenciais para o desenvolvimento embrionário inicial (Hardy & Spanos, 2002). Segundo alguns autores (Hossner *et al.*, 1997; Riley & Moley, 2006), tal fato está relacionado aos efeitos dos fatores de crescimento sobre a expressão gênica, metabolismo e morte celular de embriões durante a pré-implantação. Contudo, outros efeitos destes fatores também têm sido observados em embriões mamíferos no que diz respeito à taxa de desenvolvimento de blastocistos, síntese protéica, endocitose e transporte de glicose (Hardy & Spanos, 2002) (Quadro 1). Dentre os principais fatores de crescimento determinantes do desenvolvimento embrionário, destacam-se os fatores de crescimento epidermal (EGFs), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), fatores de crescimento transformadores (TGFs), fatores de necrose tumoral (TNFs) e fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs).

Quadro 1. Efeitos dos fatores de crescimento sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões mamíferos durante a pré-implantação.

Efeito	Fator de crescimento	Espécie	Referência
Formação do blastocisto ↑	Insulina	Camundongo Vaca	Harvey & Kaye (1990) Matsui <i>et al.</i> (1995)
	IGF-I	Camundongo Vaca	Harvey & Kaye (1992a) Palma <i>et al.</i> (1997)
	IGF-II	Camundongo	Harvey & Kaye (1992b)
	HB-EGF	Rato	Tamada <i>et al.</i> (1999)
Taxa de desenvolvimento ↑	IGF-II	Camundongo	Rapolee <i>et al.</i> (1992)
	EGF	Camundongo	Brice <i>et al.</i> (1993)
Nº de células do blastocisto ↑	IGF-I e IGF-II	Camundongo	Rapolee <i>et al.</i> (1992)
<i>Especificamente MCI</i> ↑	Insulina	Camundongo	Harvey & Kaye (1990)
	IGF-I	Camundongo	Harvey & Kaye (1992a)
	IGF-II	Camundongo	Harvey & Kaye (1992b)
<i>Especificamente trofotoderma</i> ↑	CSF-1	Camundongo	Bhatnagar <i>et al.</i> (1995)
Expansão da blastocele ↑	TGF α	Camundongo	Dardik & Schultz (1991)
	EGF	Camundongo	Dardik & Schultz (1991)
Eclosão do blastocisto ↑	GM-CSF	Camundongo	Robertson <i>et al.</i> (2001)
Síntese protéica ↑	Insulina	Camundongo	Harvey & Kaye (1988)
	IGF-II	Camundongo	Rapolee <i>et al.</i> (1992)
	TGF α	Camundongo	Dardik <i>et al.</i> (1992)
Endocitose	Insulina	Camundongo	Dunlison <i>et al.</i> (1995)
Transporte de glicose	Insulina	Camundongo	Kaye <i>et al.</i> (1992)
Expressão gênica	IGFs	Camundongo	Shi <i>et al.</i> (1994)
Apoptose ↓	IGF-I	Coelho	Herrler <i>et al.</i> (1998)
Apoptose ↑	TNF α	Camundongo	Wuu <i>et al.</i> (1999)

HB-EGF: Fator de crescimento epidermal de ligação à heparina; CSF-1: Fator estimulador de colônias 1; GM-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos.

(Adaptado de Hardy & Spanos, 2002)

A regulação do desenvolvimento e crescimento embrionários tem sido tradicionalmente atribuída à insulina e aos IGFs. Ambos são classificados como polipetídeos de baixo peso molecular (6 kDa e 7,5 kDa, respectivamente) e apresentam características estruturais bastante semelhantes entre si (Robinson *et al.*, 2000). A insulina, produzida pelas células β -pancreáticas, atua sobre uma grande variedade de tecidos corporais, tais como fígado, músculos, glândulas mamárias e ovário (Sasaki, 2002). A nível ovariano, a insulina, juntamente com alguns importantes membros da família IGF (IGF-I e IGF-II), têm demonstrado estimular o desenvolvimento folicular, esteroidogênese, maturação oocitária e subsequente desenvolvimento embrionário (Yaseen *et al.*, 2001).

Como um potente hormônio anabólico em células diferenciadas, a insulina estimula o transporte de glicose e aminoácidos (Summers *et al.*, 1999) e a síntese de RNA, proteínas e glicogênio (McGowan *et al.*, 1995). Experimentos realizados *in vivo* demonstraram que a insulina melhora a taxa de desenvolvimento embrionário e a taxa de gestação em animais diabéticos, resgatando os embriões dos efeitos prejudiciais da hiperglicemia materna (De Hertogh *et al.*, 1992). Além disso, estudos com embriões em fase de pré-implantação constataram que o desenvolvimento embrionário é melhorado após suplementação do meio de cultivo com insulina e IGF-I (Herrler *et al.*, 1998; Spanos *et al.*, 2000).

Muitas evidências indicam que, do mesmo modo que a insulina, os fatores de crescimento da família IGF desempenham um importante papel no início do desenvolvimento embrionário. Em bovinos, a adição de IGF-I ou IGF-II exógenos ao meio de cultivo resultou em uma melhor maturação de oócitos e desenvolvimento de embriões (Mihalik *et al.*, 2000). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que o IGF-I e o IGF-II estimulam a produção de IFN- τ pelo embrião (Ko *et al.*, 1991), exercendo um provável efeito benéfico sobre o desenvolvimento embrionário, e também uterino, durante a gestação inicial (Wathes *et al.*, 1998). De fato, receptores da família IGF já foram identificados em embriões em estágio de pré-implantação (Watson *et al.*, 1992; Markham & Kaye, 2003) (Figura 6) e no epitélio glandular do útero de ovinos (Reynolds *et al.*, 1997), reforçando o papel dos IGFs no desenvolvimento embrionário e uterino.

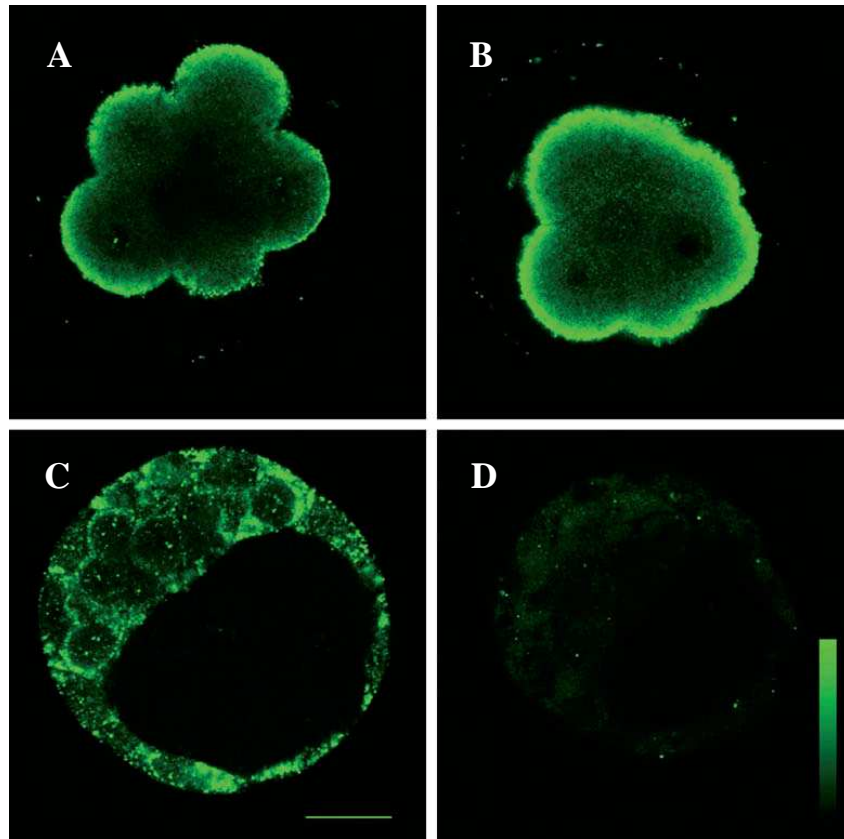


Figura 6. Identificação de receptores para o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) em diferentes estádios embrionários durante a pré-implantação: (A) Embrião de 8 células; (B) Mórula inicial; (C) Blastocisto; (D) IgG utilizada como anticorpo primário para a coloração dos blastocistos. A cor verde fluorescente indica maior intensidade de coloração (Adaptado de Markham & Kaye, 2003).

Em camundongos, receptores funcionais para insulina e IGF-I são expressos a partir do estágio pré-implantacional de oito células, mais especificamente durante a compactação (Harvey & Kaye, 1992c; Rappolee *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1993). A partir desse último estágio, que marca o início da diferenciação embrionária levando à formação do blastocisto (Gardner & Johnson, 1975), muitos parâmetros da fisiologia embrionária podem ser regulados por insulina ou IGF-I exógenos (Kaye & Harvey, 1995; Kaye, 1997). Um exemplo são os importantes efeitos benéficos da utilização de insulina exógena para o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*. Nesse contexto, sabe-se que embriões em estágio de pré-implantação não sintetizam insulina ou seu mRNA específico (Kaye, 1997; Lighten *et al.*, 1997), mas têm acesso à insulina materna *in vivo* via oviduto e fluidos uterinos (Heyner *et al.*, 1989). Deste modo, em condições *in vitro*, embriões em estádios iniciais são privados de tal hormônio materno, sofrendo um retardo no seu desenvolvimento morfológico e na sua proliferação celular durante a embriogênese pré-implantacional (Gardner & Kaye, 1991). Assim, é possível constatar a importância da adição de insulina exógena para o sucesso do cultivo *in vitro* de embriões.

A insulina e o IGF-I são importantes reguladores do crescimento e diferenciação celular, apresentando, ainda, um papel anti-apoptótico nos embriões em estádios iniciais de desenvolvimento (Riley & Moley, 2006). O efeito anti-apoptótico do IGF-I tem sido estudado em uma grande variedade de tecidos e células-tronco embrionárias, incluindo embriões no estágio de pré-implantação. Tal efeito parece ser mediado por receptores específicos do próprio IGF-I, já que a redução no número destes receptores aumenta significativamente o nível de apoptose e a sua super-expressão protege as células da apoptose *in vivo* (Resnicoff *et al.*, 1995). Segundo Grothey *et al.* (1999), a principal via efetora de bloqueio do IGF-I à apoptose é determinada pela ativação de uma enzima 3-quinase PI, após a ligação do IGF-I ao seu receptor, com subsequente fosforilação e sequestro de fatores pró-apoptóticos. Atuando deste modo, o IGF-I promove a inibição de caspases apoptóticas fundamentais para a efetivação do processo de morte celular programada.

Estudos recentes têm relatado que a adição de níveis fisiológicos de insulina ou IGF-I durante o cultivo *in vitro*, além de resultar em uma redução da apoptose (Augustin *et al.*, 2003; Fabian *et al.*, 2004), promove um aumento da proliferação celular em blastocistos de humanos, camundongos, coelhos e bovinos (Herrler *et al.*, 1998; Makarevich & Markkula, 2002; Augustin *et al.*, 2003). Além disso, outros trabalhos demonstraram que, em bovinos e murinos, o

tratamento de embriões com insulina promove um aumento no número de células, especificamente na massa celular interna (MCI) de blastocistos em desenvolvimento (Smith *et al.*, 1993; Sirisathien *et al.*, 2003). De acordo com Harvey & Kaye (1990), a insulina aumenta as taxas de compactação e formação de blastocistos *in vitro*, sendo os blastocistos resultantes dotados de 25% a mais de células, com todas localizadas na MCI. Considerando que a proporção de células presentes na MCI é um fator determinante para o crescimento fetal, o acesso do embrião à insulina materna durante a pré-implantação é requerido para a obtenção de um crescimento fetal ótimo.

Deste modo, é possível verificar que a insulina e os fatores de crescimento semelhantes à insulina fornecem importante suporte ao crescimento e desenvolvimento embrionários. Contudo, os mecanismos sinalizadores pelos quais estes hormônios exercem seus efeitos sobre embriões no estágio de pré-implantação não se encontram, ainda, completamente esclarecidos.

3 JUSTIFICATIVA

É reconhecido que a nutrição, aliada a outros fatores ambientais, exerce uma influência marcante sobre o desempenho reprodutivo de fêmeas de ruminantes domésticos, embora não se tenha, ainda, uma completa elucidação dos mecanismos envolvidos. Recentes estudos, contudo, têm sugerido a possibilidade de que a influência nutricional sobre a função reprodutiva seja mediada a nível ovariano. Em tais estudos, têm sido considerados os efeitos diretos de nutrientes específicos e hormônios metabólicos, como a insulina e o IGF-I, sobre o crescimento folicular ovariano, maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial.

A insulina tem sido apontada como uma importante moduladora das funções reprodutivas em rebanhos, apresentando atuação predominante a nível de ovário. Em cabras superovuladas, o aumento da insulinemia demonstrou ser um fator chave no incremento da produção de embriões, embora não tenham sido realizadas avaliações do efeito da insulina sobre a viabilidade embrionária pós-transferência e subsequente fertilidade.

Sabe-se que, em ruminantes, a insulina possui uma ação positiva sobre a expressão gênica de fatores de crescimento, como o IGF-I. Crescentes evidências indicam que, durante a fase folicular, o aumento nas concentrações plasmáticas de IGF-I após administração de insulina influencia o desenvolvimento de folículos e a função do corpo lúteo resultante. Somado a isto, elevados níveis circulantes de IGF-I na fase pré-ovulatória, determinados pelo aumento da insulinemia, também têm sido positivamente correlacionados com a produção de progesterona durante a gestação, sugerindo um efeito positivo da insulina sobre a sobrevivência embrionária. Além de tal efeito, a insulina tem demonstrado influenciar o desenvolvimento do concepto, atuando através do aumento das células da massa celular interna e do estímulo à secreção de histótrofos uterinos.

Nesse contexto, e considerando a escassez de estudos em caprinos, este trabalho justifica-se pela importância de se conhecer e comparar os efeitos de diferentes momentos de administração de insulina sobre os parâmetros reprodutivos nesta espécie.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Em caprinos, a modificação da insulinemia antes ou após a fecundação, mediante administração de insulina exógena, influencia diretamente a sobrevivência embrionária, taxa de concepção e desenvolvimento fetal.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Comparar os efeitos de uma única administração e de repetidas administrações de insulina, antes e após a monta natural, sobre a sobrevivência embrionária, taxa de concepção e desenvolvimento fetal de cabras da raça Anglo-Nubiana.

5.2 Específicos

- Mensurar os níveis plasmáticos de insulina até o 10º dia após a sua primeira administração;
- Mensurar os níveis plasmáticos de progesterona até o 10º dia após a primeira aplicação de insulina;
- Determinar a taxa de concepção aos 30, 45 e 60 dias pós-cobertura;
- Verificar o diâmetro da vesícula embrionária/fetal, diâmetro dos placentomas e crescimento fetal, através de mensurações realizadas por ultra-sonografia;
- Verificar o tipo de parto (simples ou múltiplo) e a taxa de prolificidade;
- Verificar o peso vivo médio das crias ao nascimento.

6 CAPÍTULO 1**ASSOCIAÇÃO ENTRE ADMINISTRAÇÕES SIMPLES OU REPETIDAS DE INSULINA
E TRATAMENTO COM PROSTAGLANDINA F2 α EM CABRAS: EFEITO SOBRE
PERDAS EMBRIONÁRIAS, TAXA DE CONCEPÇÃO E DESENVOLVIMENTO FETAL**

*(Association between Single or Repeated Insulin Administration and Prostaglandin F2 α
Treatment in Goats: Effect on Embryonic Losses, Conception Rate and Fetal Development)*

Reproduction in Domestic Animals

(Submetido em novembro de 2008)

Association between Single or Repeated Insulin Administration and Prostaglandin F_{2a} Treatment in Goats: Effect on Embryonic Losses, Conception Rate and Fetal Development

Lima, I.M.T.¹, Rondina D.^{1a}, Souza A.L.¹, Rodrigues M.R.C.¹, Arruda I.J.¹, Galeati G.², Araújo A.A.¹, Teixeira D.I.A.¹, Govoni N.², Pinheiro E.S.P.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: +55-85-31019858.

E-mail: davide@pq.cnpq.br

Resumo

Trinta e uma cabras da raça Anglo-Nubiana tiveram o estro sincronizado por meio de duas administrações de 100 µg de cloprostenol, intervaladas por 11 dias, sendo posteriormente submetidas à monta natural. Nesse período, todas as fêmeas receberam administrações de insulina humana de longa duração (0,2UI/kgPV/dia). Os animais do primeiro grupo (Insulina I) (n = 10) foram submetidos a uma única administração de insulina, concomitante à segunda aplicação de cloprostenol (Dia 0). As cabras do segundo grupo (Insulina III) (n = 11) receberam três aplicações de insulina (Dias 0, 3 e 6) e as cabras no terceiro grupo (Insulina IV) (n = 10) foram sujeitas a um total de quatro aplicações (Dias 0, 3, 6 e 9). Colheitas de sangue foram realizadas nos Dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10 a partir da segunda administração de cloprostenol para avaliação dos níveis de insulina e progesterona. O diagnóstico de gestação e as mensurações dos conceptos e placentomas foram realizadas aos 30, 45 e 60 dias após a monta por ultra-sonografia. As mudanças cumulativas de insulina plasmática e os níveis circulantes de progesterona nas cabras gestantes aumentaram positivamente durante o período de avaliação, não sendo observado efeito dos tratamentos (P > 0,05). Nos animais não gestantes, as concentrações de progesterona

permaneceram abaixo de 1 ng/mL. As taxas de concepção e do concepto diminuíram significativamente com o aumento das administrações de insulina ($P < 0,05$). Em ambos os parâmetros, o grupo Insulina I apresentou maiores médias (85,71% e $1,71 \pm 0,18$) em relação aos demais grupos. O maior número de aplicações de insulina também afetou negativamente o diâmetro dos placentomas e vesículas ($P < 0,05$), porém não determinou efeitos sobre o comprimento crânio-caudal e diâmetro biparietal fetais ($P > 0,05$). Repetidas administrações de insulina não resultaram em um efeito benéfico sobre o tratamento de sincronização do estro com cloprostenol. No entanto, uma única administração de insulina antes da monta natural manteve uma maior proporção de cabras gestantes, atuando positivamente sobre a fertilidade.

Contents

Thirty-one Anglo-Nubian goats had their estrus synchronized by two administrations of 100 µg cloprostenol, 11 days apart and successively mated. During this period, females were treated with unique long-acting human insulin (0.2IU/kgBW/day) (Insulin I) (n = 10) at second cloprostenol dose (Day 0), three insulin injections (Insulin III) (n = 11) at Day 0, 3 and 6, and four doses (Insulin IV) (n = 10) at Day 0, 3, 6 and 9. Insulin and Progesterone levels were obtained from plasma at Days 0, 2, 4, 6, 8 and 10 from the second cloprostenol administration. Pregnancy diagnosis and measurements of conceptus and placentomes were performed at 30, 45 and 60 days after mating by ultrasonography. Insulin cumulative changes and progesterone levels increased positively in pregnant does during the assay period, with no effect ($P > 0.05$) of the treatment. In no-pregnant animals, progesterone maintained its concentration below 1ng/mL. Conception and conceptus rates decreased significantly with an increase in insulin administration ($P < 0.05$). In both parameters, Insulin I showed higher means (85.71% and 1.71 ± 0.18). Number of insulin doses also affected placentome and vesicle diameter negatively ($P < 0.05$), not finding differences in crown-rump length and fetus biparietal diameter ($P > 0.05$). Collectively, no beneficial results from the administration of repeated insulin doses for cloprostenol treatment have been found. By contrast a single insulin dose before mating resulted in a higher percentage of pregnant goats, also promoting fertility traits.

Introduction

Estrus synchronization in goats can be achieved in the breeding season through luteolysis induction with two consecutive prostaglandin F_{2α} doses, or their analogues, 9-11 days apart (Nutti et al. 1992). This hormonal treatment is efficient in synchronizing estrus in cyclic goats, besides being a practical low-cost method (Kusina et al. 2000). However, according to data, goat fertility at first service is reduced in comparison to treatment with progestagen sponges (Kusina et al. 2000; Fernandez-Moro et al. 2008). Studies in sheep demonstrated that this low fertility rate occurs due to an alteration in ovulatory follicular dynamics and/or in the timing of ovulation (Barret et al. 2002). In goats, however, there is still little data on possible reasons for reduced conception rates after prostaglandin treatment (Fernandez-Moro et al. 2008).

Low conception rates in ruminants are directly associated to damage to initial embryo development and subsequent implantation phenomenon (Leroy et al. 2008). A great number of factors are involved in embryo implantation reduction, including oocyte quality and inadequate maternal environment (Green et al. 2005).

Insulin has been linked to steroid hormone synthesis (Gutierrez et al. 1997) and advance of the first ovulation postpartum in cattle (Gong et al. 2002). Recent studies revealed that the increase in plasma insulin before or after breeding equally increased the proportion of viable embryos in donor goats (Selvaraju et al. 2003; Souza et al. 2008). Insulinaemia rates are positively related to circulating IGF-I levels (Gong 2002) and indirectly, to progesterone production (Peclaris et al. 1999). Additional studies have established a relation between lower maternal progesterone concentrations and reduced embryo development (Mann and Lamming 2001), with negative direct effects of low progesterone rates on embryo survival and implantation.

Therefore, insulin administration can be considered an alternative means to improve fertility in goats synchronized with prostaglandin F_{2α}, affecting positively the embryo survival and implantation. Based on this hypothesis, the aim of this study was to investigate the effects of single and repeated insulin administrations on the fertility of Anglo-Nubian goats synchronized with prostaglandin F_{2α} treatment.

Materials and Methods

Animals and management

The experiment was conducted with thirty-one adult and cyclic Anglo-Nubian goats at the Experimental Station of State University of Ceará, located at 4° 02' S and 38° 30' W, Guaiuba, Ceará, north-eastern of Brazil. All animals were maintained in similar feeding and management conditions. Goats grazed free-ranged on natural pastures during the day and were penned overnight. Herein animals received 300g/head of concentrate with 18% of crude protein.

Estrus synchronization and mating

Goat estrus were synchronized using two intramuscular cloprostenol injections of 100 µg each (Ciosin[®], Schering-Plough Coopers, Brazil), 11 days apart. Twenty-four hours after the second cloprostenol administration, two Anglo-Nubian fertile bucks were mixed with the goats and kept with them for 96 hours. Markers impregnated with colored oil paint were applied on bucks to enable identification of mated goats. As goats were being mated, they were separated from bucks. Goats that were unresponsive to synchronization treatment or not pregnant were submitted to a second mating for 45 days with the same bucks, to determine the causes of reproductive failure.

Insulin administration

After estrus synchronization and before mating, goats were distributed in three groups with similar ($P > 0.05$) age (27.94 ± 0.98 months) and body weight (32.25 ± 0.77 kg) mean \pm SEM: Insulin I (n = 10), Insulin III (n = 11) and Insulin IV (n = 10) groups. All females were treated with long acting human insulin, 0.2UI/kgBW/day (Novolin[®], Novo Nordisk A/S, Denmark) subcutaneously. Goats from Insulin I group were administered a single insulin dose at the second cloprostenol injection (Day 0). Insulin III group received three insulin doses at Day 0, Day 3 and Day 6 whereas in Insulin IV group were given four insulin doses at Day 0, Day 3, Day 6 and Day 9.

Progesterone and Insulin assay

Blood samples were taken from seven animals of each group at Day 0 every two days until Day 10, before feeding and insulin administration and were collected in heparinized tubes by venipuncture. Progesterone and insulin were assessed by RIA kit (IBL International GmbH, Flughafenstr, Hamburg, Germany) (Rondina et al. 2005).

Ultrasonography measures

Pregnancy diagnosis and measurements of conceptus were performed at 30, 45 and 60 days after mating. Goats were examined both transrectally and transabdominally. The transrectal examination was performed in standing position using a Pie Medical Scanner (Falco 100, Pie Medical equipment B.V., Maastricht, Holland) attached with 6.0/8.0 MHz linear array transducer. The transducer was fitted in a self manufactured connector to favor manipulation in the rectum. For transabdominal examination, animals were restrained standing, and the transducer (3.5/5.0 MHz) was placed on the hairless area of the ventral abdominal wall just in front of the udder.

Uterus was scanned to measure the diameter of embryonic/fetal vesicle, placentome diameter, fetus crown-rump length (CRL) and fetus biparietal diameter (BPD). Ultrasonic cross-sectional images of the embryonic/fetal vesicles were measured at their maximal diameter (Martinez et al. 1998). Usually, a number of placentomes could be observed in the same image. In this study, two large-size placentomes were measured and mean diameter was calculated (Lee et al. 2005). The CRL was measured as a straight line between fetal crown and the origin of the tail (Ali and Hayder 2007). The fetus BPD measurement was performed according to Lee et al. (2005), from images in which the axis of head symmetry was perpendicular to the ultrasound beam.

Statistical Analysis

All data were analyzed using SAS program software (SAS, Inc., Cary, NC, USA). Differences among proportions or numbers were performed using chi-squared test. Comparison among treatments (I, III and IV insulin doses) in progesterone and insulin levels, was performed by Duncan Test. The effect of Insulin administration on conception and conceptus rates was analyzed by repeated measures analysis for categorical variables (CATMOD procedures). In

placenta and fetus traits effect of Insulin treatment was tested by GLM procedures for repeated measures analysis of variance. Day of gestation (30, 45 and 60 days) was the repeated measure.

Results

All goats (21/21) from Insulin III and Insulin IV groups were marked throughout the mating period by bucks (Fig. 1), whereas in the single insulin administration treatment a lower ($P < 0.05$) proportion of females (7/10) displayed a visible mark at mating. Although the mating period was extended to 96 hours after the second PGF2 α dose (Fig. 1), the first detection of painted goats was recorded around 48 hours. This period also showed the larger rate ($P < 0.05$) of does bred (21/28) (Fig 1).

Figure 2 shows insulin and progesterone levels in pregnant goats (Insulin I, III and IV groups) and in animals with gestation failure detected by ultrasonography at 30 day of pregnancy (No-pregnant group). In all females, cumulative changes on plasmatic insulin concentration increased positively, with a higher value for Insulin IV goats from 6 to 10 days after the second PGF2 α injection ($P > 0.05$). In does, mean of insulin level during the assay interval was $11.93 \pm 0.81 \mu\text{U/mL}$.

Pregnant goats showed a progressive rise in progesterone ($> 1 \text{ ng/mL}$) after 6 days of the second PGF2 α dose, indicating the occurrence of gestation. No differences were observed between Insulin groups ($P > 0.05$) except in the 6 day, when animals from Insulin III exhibit a lower progesterone concentration ($P < 0.05$). In No-Pregnant goat group, progesterone rates kept stable below the 1 ng/mL , signaling gestation failure.

Conception (No of does pregnant / No of does mated) and conceptus (No of conceptus / No of does mated) rates (Table 1) as well as measures of placenta and fetus traits (Table 2) were established by ultrasonography from 30 to 60 days of gestation. Treatment with single insulin dose maintained during gestation interval highest pregnancy values of (85.71%) and conceptus rate (1.71 ± 0.18). Furthermore in both parameters, statistical analysis confirmed a negative effect of increasing number of insulin administrations ($P < 0.05$). In Insulin III and Insulin IV groups, a pregnancy loss of 60% and 50% respectively was observed after 60 days of gestation. For the same treatments, conceptus rate achieved twice the low mean, if compared to the goats treated with single dose (0.80 ± 0.20 pooled mean vs. 1.71 ± 0.18).

Concerning the measures associated to fetal development, the effect of insulin was significant ($P < 0.05$) in placentome and vesicle diameter (Table 2), whereas for the fetus crown-rump length and biparietal diameter, similar results were found among the different groups ($P > 0.05$).

In the second period of mating, the percentage of pregnant animals was 86.67% (13/15). Necropsy confirmed reproductive pathology in only two goats (2/15). These two animals were not considered for data analysis.

Discussion

Our fertility results after a single insulin dose in estrus treatment synchronization (85.71%) were superior to the percentages reported in goats (67%) (Kusina et al. 2000) and sheep (70.6%) (Gonzalez-Bulnes et al. 2005) that were subject to the same estrus synchronization protocol, but without insulin administration. Positive effects of insulin on maturation and oocyte quality and the production of high quality embryos are well documented in literature. A number of studies have demonstrated the importance of insulin in the regulation of ovarian functions. Cell culture studies have shown bovine granulosa cells to be critically dependent on the presence of physiological concentrations of insulin (Glister et al. 2001). Moreover, diet-induced increases in circulating concentrations of insulin with increased estradiol production in cultured granulosa cells from small antral follicles have been demonstrated (1 to 4 mm) (Armstrong et al. 2002), thus suggesting a direct action of insulin on follicle function. Increased intake of highly degradable protein resulted in increased concentrations of ammonia in follicular fluid, but decreased peripheral concentrations of insulin (Sinclair et al. 2000). These changes were associated to altered follicular growth patterns and reductions in both the number of ova that cleaved and the proportion that developed to the blastocyst stage.

Recent studies on insulin effects on bovine blastocyst development in vitro have shown that insulin increases cleavage rates and total cell number and causes a reduction in the number of apoptotic bodies, contributing positively to embryo development (Augustin et al. 2003). In addition, enhancement of early embryo development has recently been demonstrated in heifers fed a diet that increased the insulin-glucagon ratio (Mann et al. 2003). Changes in insulin are closely related to IGF-I concentrations (O'Callaghan and Boland 1999). In turn, IGF-I is an

important mediator of follicular development, steroidogenesis, oocyte maturation and embryonic development (Yassen et al. 2001). The IGF-1 receptor is expressed throughout the bovine pre-implantation embryo (Lonergan et al. 2000) and IGF-1 as insulin added in vitro improves embryonic development (Mihalik et al. 2000) contributing to the enhancement of embryo survival and pregnancy rates.

In our study, however, it was verified that groups that received insulin administrations for a longer period presented a conception rate reduction. In these groups, benefic effects of insulin on the oocyte have probably been negatively affected by additional exogenous insulin administrations during the early embryo development. Such hypothesis can be explained by the harmful effects of high plasma insulin levels to initial embryonic development. Indeed, studies have demonstrated that exposure to high insulin and IGF-I concentrations, results in the induction of apoptosis in murine blastocysts (Chi et al. 2000). This increase in apoptosis is the result of a decrease in the IGF-I receptor expression (down-regulation) and is related to a decrease in insulin-stimulated glucose uptake, possibly via the main insulin-regulated glucose transporter in the blastocyst, namely GLUT8 (Carayannopoulos et al. 2000). The uncontrolled apoptosis or programmed cell death occurring during embryonic pre-implantation may lead to embryo demise (Moley et al. 1998; Chi et al. 2000) and consequently, to embryo resorption and lower conception rates (Pinto et al. 2002).

The direct action of glucose has also been tested, and Rubio et al. (1997) observed pregnancy rate reductions in sheep submitted to glucose infusion. This method may increase ovulation rate in sheep (Downing et al. 1995), but embryo quality may be drastically reduced (Yaakub et al. 1999). Boland et al. (2001) suggests that the effect of glucose upon embryonic development may be related to the fact that high glucose concentrations in the protoplasm interfere with cellular signaling during preovulatory follicle growth, the development of oocytes, or initial embryonic development.

The embryonic development depends both on its inherent developmental potential (embryo quality) and the adequacy of the uterine environment in which it must develop. The main hormone controlling the uterine environment is progesterone, and circulating concentrations of maternal progesterone are closely linked to early embryo development (Mann et al. 1999; Mann and Lamming 2001). Diskin et al. (2004) demonstrated the existence of a linear quadratic association between plasma progesterone concentrations and embryo survival in beef heifers.

Evidence suggests that progesterone plays an important role in uterine secretions regulation, such as proteins and growth factors, essential for initial embryo development. Therefore, low plasma progesterone levels can affect embryo development, possibly for causing an alteration in endometrial secretions, which induces a reduction of IFN- τ secretion by the embryo, making more difficult for this protein to prevent prostaglandin F 2α endometrial secretion and the consequent luteolysis. Such observations confirm the important role of plasma progesterone in embryo growth and development, as well as in their survival rate (Sreenan et al. 2001). Differently from observations made by Mann et al. (2003), our data suggests that maternal plasma progesterone concentrations seem to be the main factor in determining embryo development during pre-implantation, thus playing a key role with regard to plasma insulin levels during this period.

Insulin is considered an important hormone for fetal growth, as it increases energetic substrate availability and stimulates placenta growth (Jainudeen & Hafez, 2000). Within the fetus, insulin promotes cell proliferation in bone and soft tissue (Fowden, 1995) and IGF-I regulates skeletal and muscle development (Lok et al. 1996; Bass et al. 1999). Both IGF-I and insulin concentrations are lower in higher yielding cows during the postpartum period (Taylor et al. 2003) and decrease as cows get older (Taylor et al. 2004). Reductions in these endocrine signals may contribute negatively to fetal development and cause smaller size at birth in offspring (Swali & Wathes, 2006). Although insulin appears to affect fetal growth, our study verified that the type of insulin administration does not imply different effects on fetus size; however it does affect placentome and embryo vesicle diameters. Likewise, Wetterau et al. (1999) proved that high plasma insulin levels observed in high body condition ewes resulted in the formation of less developed placentomes and with lower weight than those found in lower condition ewes. An inverse relationship between maternal insulin and placental size has also been reported (Wallace et al. 1997). With regard to fetal size, Osgerby et al. (2003) verified that sheep showing higher plasma insulin concentrations during gestation presented fetuses with crown-rump lengths significantly higher than fetuses of animals with lower circulating insulin levels, differing from findings obtained in our work. However, our results agree with the findings of Vonnahme et al. (2006), who also did not observe effects of different maternal insulinaemia levels on the crown-rump length of sheep fetuses.

In conclusion, the present work demonstrated that the use of repeated doses of insulin before and after breeding in prostaglandin F₂ α -synchronized goats is harmful for conception and fertility rates. On the other hand, results suggest that the administration of a single exogenous insulin dose can be a useful supporting tool for prostaglandin F₂ α treatment, enhancing fertility rates.

Acknowledgements

I.M.T. Lima was the recipient of a Ms.Sc. scholarship from CNPq/Brazil under supervision of Prof. Davide Rondina. The authors extend their thanks to the staff of Ceará State University, “Campo da Semente” Farm Experimental Station for the care, handling and management of experimental animals.

References

Ali A, Hayder M, 2007: Ultrasonographic assessment of embryonic, fetal and placental development in Ossimi sheep. *Small Rum Res* 73, 277-282.

Armstrong DG, Gong JG, Gardner JO, Baxter G, Hogg CO, Webb R, 2002: Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction* 123, 371–378.

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.

Barret DW, Bartlewski PM, Cook SJ, Rawlings NC, 2002: Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF₂a given at different stages of the luteal phase in ewes. *Theriogenology* 58, 1409–1424.

Bass J, Oldham J, Sharma M, Kambadur R, 1999: Growth factors controlling muscle development. *Dom Anim Endocrinol* 17, 191–197.

Boland MP, Lonergan P, O’Callaghan D, 2001: Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 55, 1323–1340.

Carayannopoulos M, Chi M, Cui Y, Pingsterhaus J, Moley K, 2000: GLUT8, a glucose transporter responsible for insulin-stimulated uptake in the blastocyst. *Proceeding National Academy Science USA* 97, 1421-1424.

Chi MMY, Schlein AL, Moley KH, 2000: High insulin-like growth factor I (IGF-I) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-I receptor. *Endocrinology* 141, 4784-4792.

Diskin MG, Stronge AJH, Morris DG, Kenny DA, Sreenan JM, 2004: The association between early luteal phase concentrations of progesterone and embryo survival in heifers and dairy cows. *J Anim Sci* 82, 101.

Downing JA, Joss J, Scaramuzzi RJ, 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.

Fernandez-Moro D, Veiga-Lopez A, Ariznavarreta C, Tresguerres JAF, Encinas T, Gonzalez-Bulnes A, 2008: Preovulatory Follicle Development in Goats Following Oestrous Synchronization with Progestagens or Prostaglandins. *Reprod Dom Anim* 43, 9-14.

Fowden A, 1995: Endocrine regulation of fetal growth. *Reprod Fert Dev* 7, 351–363.

Glister C, Tannetta DS, Groome NP, Knight PG, 2001: Interactions Between Follicle-Stimulating Hormone and Growth Factors in Modulating Secretion of Steroids and Inhibin-Related Peptides by Nonluteinized Bovine Granulosa Cells. *Biol Reprod* 65, 1020-1028.

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

Gong JG, Lee WJ, Garnsworthy PC, Webb R, 2002: Effect of dietary induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction* 123, 419–427.

Gonzalez-Bulnes A, Veiga-Lopez A, Garcia P, Garcia-Garcia RM, Ariznavarreta C, Sanchez MA, Tresguerres JAF, Cocero MJ, Flores JM, 2005: Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology* 63, 2523–2534.

Green MP, Hunter MG, Mann, GE, 2005: Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 88, 179–189.

Gutierrez CG, Campbell BK, Webb R, 1997: Development of a longterm bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle stimulating hormone and morphological characteristics. *Biol Reprod* 56, 608–616.

Jainudeen MR, Hafez ESE, 2000: Gestation, prenatal physiology and parturition. In: Hafez ESE. (Ed.), *Reproduction in Farm Animals*, 7th ed. Lea and Febiger, Philadelphia, p. 148.

Kusina NT, Tarwirei H, Hamudikuwanda H, Agumba G, Mukwena J, 2000: A comparison of the effects of progesterone sponges and ear implants, PGF_{2a}, and their combination on efficacy of estrus synchronization and fertility of Mashona goat does. *Theriogenology* 53, 1567–1580.

Lee Y, Lee O, Cho J, Shin H, Choi Y, Srim Y, Choi W, Shin H, Lee D, Lee G, Shin S, 2005: Ultrasonic measurement of fetal parameters for estimation of gestational age in Korean black goats. *J Vet Med Sci* 67, 497–502.

Leroy JLMR, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts IGF, Bols PEJ, 2008: 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. *Reprod Dom Anim* 43, 612-622.

Lok F, Owens JA, Mundy L, Robinson JS, Owens PC, 1996: Insulin like growth factor I promotes growth selectively in fetal sheep in late gestation. *Am J Physiol* 270, 1148–1155.

Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Pintado B, Fair T, Ward F, de la Fuente J, Boland M, 2000: Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptors, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Develop* 57, 146–152.

Mann GE, Green MP, Sinclair KD, Demmers KJ, Fray MD, Gutierrez CG, Garnsworthy PC, Webb R, 2003: Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. *Anim Reprod Sci* 79, 71–79.

Mann GE, Lamming GE, 1999: The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Dom Anim* 34, 269–274.

Mann GE, Lamming GE, 2001: Relationship between the maternal endocrine environment, early embryo development and the inhibition of the luteolytic mechanism in the cow. *Reproduction* 121, 175–180.

Martinez MF, Bosch P, Bosch RA, 1998: Determination of early pregnancy and embryonic growth in goat by transrectal ultrasound scanning. *Theriogenology* 49, 1555–1565.

Mihalik J, Rehak P, Koppel J, 2000: The influence of insulin on the in vitro development of mouse and bovine embryos. *Physiol Res* 49, 347–354.

Moley KH, Chi MMY, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Mueckler MM, 1998: Hyperglycemia induces apoptosis in preimplantation embryos via cell death effector pathways. *Nature Med* 12, 1420-1424.

Nuti LC, Bretzlaff KN, Elmore RG, Meyers SA, Rugila JN, Brinsko SP, Blanchard TL, Weston PG, 1992: Synchronization of estrus in dairy goats treated with prostaglandin F_{2α} at various stages of the estrous cycle. *Am J Vet Res* 53, 935–937.

O’Callaghan D, Boland MP, 1999: Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Anim Sci* 68, 299–314.

Osgerby JC, Gadd TS, Wathes DC, 2003: The effect of maternal nutrition and body condition on placental and foetal growth in the ewe. *Placenta* 24, 236–47.

Peclaris GN, Koutsotolis K, Seferiadis K, Mantzios A, Nikolaou E, Kolios G, 1999: Effect of monensin and progesterone priming on ram-induced reproductive performance of Boutsikio mountain breed ewes. *Theriogenology* 51, 531–540.

Pinto AB, Schlein AL, Moley K.H, 2002: Preimplantation exposure to high insulin-like growth factor I concentrations results in increased resorption rates in vivo. *Hum Reprod* 17, 457-462.

Rondina D, Freitas VJF, 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.

Rubio JM, Hallford DM, Hawkins DE, 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.

Selvaraju S, Agarwal SK, Karche SD, Majumdar AC, 2003: Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats treated with insulin. *Theriogenology* 59, 1459-1468.

Sinclair KD, Kuran M, Gebbie FE, Webb R, McEvoy TB, 2000: Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *J Anim Sci* 78, 2670–2689.

Souza AL, Galeati G, Almeida AP, Arruda IJ, Govoni N, Freitas VJF, 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.

Sreenan JM, Diskin MG, Morris DG, 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.

Swali A, Wathes DC, 2006: Influence of the dam and sire on size at birth and subsequent growth, milk production and fertility in dairy heifers. *Theriogenology* 66, 1173-1184.

Taylor VJ, Beever DE, Wathes DC, 2003: Physiological adaptations to milk production that affect fertility in high yielding dairy cows. *Dairying, using science to meet consumer needs. Br Soc Anim Sci* 29, 37-71.

Taylor VJ, Cheng Z, Pushpakumara PGA, Beever DE, Wathes DC, 2004: Fertility and yield in lactating dairy cows: relationship to plasma IGF-I in the peripartum period. *Vet Rec* 155, 583-588.

Vonnahme KA, Hess BW, Nijland MJ, Nathanielsz PW, Ford SP, 2006: Placentomal differentiation may compensate for maternal nutrient restriction in ewes adapted to harsh range conditions. *J Anim Sci* 84, 3451-3459.

Wallace JM, Da Silva P, Aitken RP, Cruickshank MA, 1997: Maternal endocrine status in relation to pregnancy outcome in rapidly growing adolescent sheep. *J Endocrinol* 155, 359-368.

Wetterau LA, Moore MG, Lee KW, Shim ML, Cohen P, 1999: Novel aspects of the insulin-like growth factor binding proteins. *Mol Genet Metab* 68, 161-181.

Yaakub H, O'Callaghan D, Boland MP, 1999: Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology* 51, 1259-1266.

Yaseen MA, Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H, 2001: Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. *Reproduction* 122, 601-610.

List of Figures

Figure 1.

Percentage of goats marked at mating according to the insulin group. Distribution of goat marked (%) (n = 28) (Grey mark) and cumulative percentage of goats marked/exposed (n = 31) (Dark mark), according to the time (hours) from second PGF_{2α} dose. ^{a,b}P < 0.05.

Figure 2.

Mean cumulative changes of insulin and progesterone levels according to the days from second PGF_{2α} dose in pregnant goats (n = 12) treated with single or repeated administration of insulin. Data from No-pregnant group are referred to animals (n = 5) with gestation failure detected at 30 days of pregnancy. Values are given in means ± SEM.

List of Tables

Table 1.

Conception rate (%) and conceptus rate (n) from 30 to 60 days of gestation in goats treated with single or repeated doses of insulin. Values of conceptus rate are given in means ± SEM.

Table 2.

Placenta and fetus traits from 30 to 60 days of gestation in goats treated with single or repeated doses of insulin. Values are given in means ± SEM.

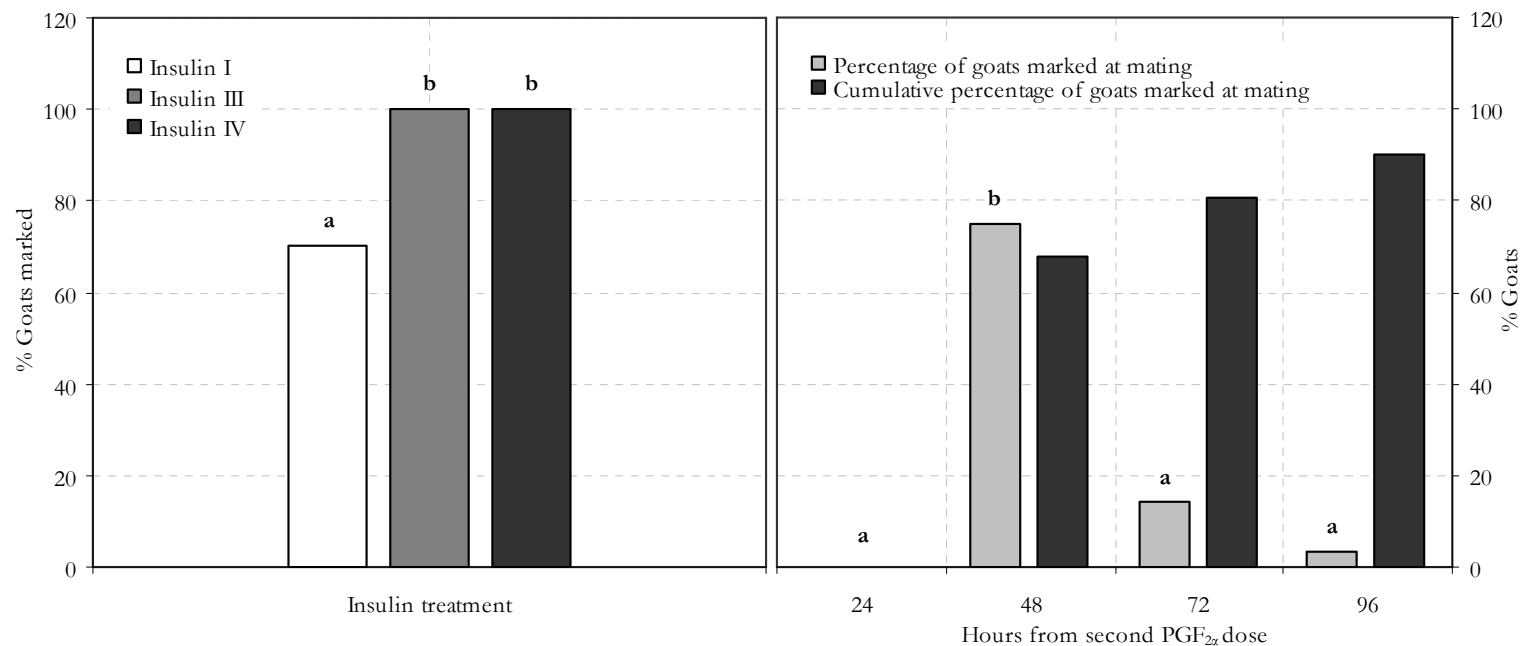


Figure 1. Percentage of goats marked at mating according to the insulin group. Distribution of goat marked (n = 28) (Grey mark) and cumulative percentage of goats marked/exposed (n = 31) (Dark mark), according to the time (hours) from second PGF_{2α} dose. ^{a,b} P < 0.05.

Insulin I Group: received one dose of insulin (0,2UI/KgBW/day) at Day 0

Insulin III Group: received three doses of insulin (0,2UI/KgBW/day each) at Days 0, 3 and 6

Insulin IV Group: received four doses of insulin (0,2UI/KgBW/day each) at Days 0, 3, 6 and 9

** Day 0: second PGF_{2α} administration.*

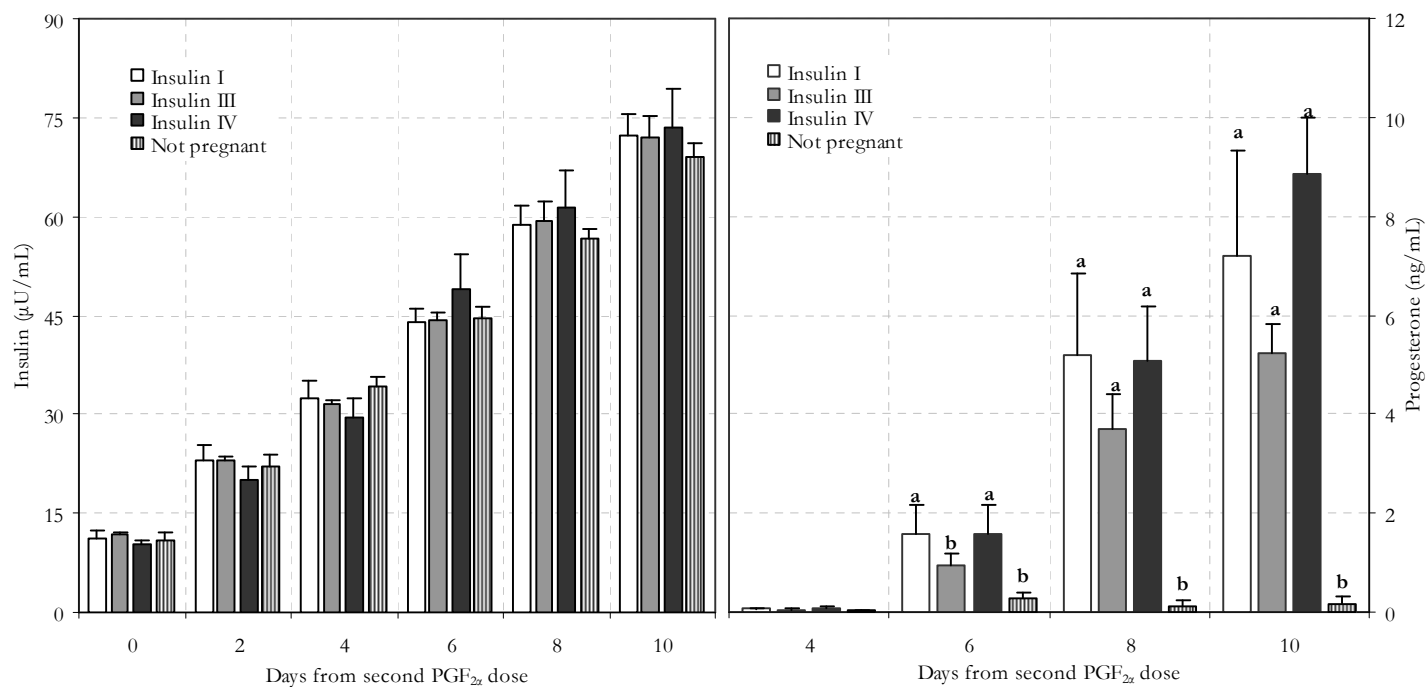


Figure 2. Mean cumulative changes of insulin and progesterone levels according to the days from second PGF_{2α} dose in pregnant goats (n = 12) treated with single or repeated administration of insulin. Data from No-Pregnant group are referred to animals (n = 5) with gestation failure detected at 30 days of pregnancy. Values are given in means ± SEM.

Insulin I Group: received one dose of insulin (0,2UI/KgBW/day) at Day 0

Insulin III Group: received three doses of insulin (0,2UI/KgBW/day each) at Days 0, 3 and 6

Insulin IV Group: received four doses of insulin (0,2UI/KgBW/day each) at Days 0, 3, 6 and 9

** Day 0: second PGF_{2α} administration.*

Table 1. Conception rate (%) and conceptus rate (n) from 30 to 60 days of gestation in goats treated with single or repeated doses of insulin. Values of conceptus rate are given in means \pm SEM.

Parameters	30 days of gestation			45 days of gestation			60 days of gestation			Insulin
	I	III	IV	I	III	IV	I	III	IV	
Conception										
rate	85.71(6/7)	63.64(7/11)	60.00(6/10)	85.71(6/7)	63.64(7/11)	50.00(5/10)	85.71(6/7)	45.45(5/11)	50.00(5/10)	**
Conceptus										
rate	-	-	-	1.71 \pm 0.18	0.91 \pm 0.16	0.80 \pm 0.20	1.71 \pm 0.18	0.73 \pm 0.19	0.80 \pm 0.20	**

NS, not significant; *P < 0.05; **P < 0.01.

Insulin I Group: received one dose of insulin (0,2UI/KgBW/day) at Day 0

Insulin III Group: received three doses of insulin (0,2UI/KgBW/day each) at Days 0, 3 and 6

Insulin IV Group: received four doses of insulin (0,2UI/KgBW/day each) at Days 0, 3, 6 and 9

* Day 0: second PGF2 α administration.

Table 2. Placenta and fetus traits from 30 to 60 days of gestation in goats treated with single or repeated doses of insulin. Values are given in means \pm SEM.

Parameters (cm)	30 days of gestation			45 days of gestation			60 days of gestation			Insulin
	I	III	IV	I	III	IV	I	III	IV	
Placentome	0.89 \pm 0.02	0.62 \pm 0.06	0.57 \pm 0.06	1.35 \pm 0.05	1.21 \pm 0.05	1.25 \pm 0.03	2.43 \pm 0.13	2.45 \pm 0.25	2.17 \pm 0.18	*
Vesicle	3.85 \pm 0.33	4.23 \pm 0.41	3.49 \pm 0.37	6.99 \pm 0.29	6.93 \pm 0.28	6.22 \pm 0.40	-	-	-	**
Fetus length	-	-	-	4.32 \pm 0.17	4.04 \pm 0.17	4.44 \pm 0.14	9.26 \pm 0.38	8.62 \pm 0.54	7.91 \pm 0.55	NS
BPD	-	-	-	1.32 \pm 0.05	1.47 \pm 0.06	1.42 \pm 0.07	2.41 \pm 0.07	2.40 \pm 0.09	2.23 \pm 0.14	NS

NS, not significant; *P < 0.05; **P < 0.01.

Insulin I Group: received one dose of insulin (0,2UI/KgBW/day) at Day 0

Insulin III Group: received three doses of insulin (0,2UI/KgBW/day each) at Days 0, 3 and 6

Insulin IV Group: received four doses of insulin (0,2UI/KgBW/day each) at Days 0, 3, 6 and 9

** Day 0: second PGF2 α administration.*

7 CAPÍTULO 2

EFEITO DE ADMINISTRAÇÕES SIMPLES OU REPETIDAS DE INSULINA ANTES E APÓS A MONTA NATURAL SOBRE A PROLIFICIDADE DE CABRAS DA RAÇA ANGLO-NUBIANA

(Effect of single or repeated insulin administrations before and after mating on litter size in Anglo-Nubian goats)

**Animal Reproduction -
Official Journal of the Brazilian College of Animal Reproduction**

(Aceito para publicação em setembro de 2008)

Vol.6, N.1, Pág.221 / Janeiro-Março 2009

Effect of single or repeated insulin administrations before and after mating on litter size in Anglo-Nubian goats

I.M.T. Lima, A.L. Souza, I.J. Arruda, M.R.C. Rodrigues, A.M. Silva, A.N. Godinho, L.D. Gonçalves, A.A. Araújo, D.I.A. Teixeira, D. Rondina

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

Resumo

Em caprinos, dados a respeito do papel da insulina sobre a prolificidade ainda são bastante escassos. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar e comparar os efeitos de administrações simples e repetidas de insulina sobre a prolificidade de cabras da raça Anglo-Nubiana. Trinta e uma cabras desta raça tiveram o estro sincronizado por meio de duas administrações de 100 µg de cloprostenol, intervaladas por 11 dias. Após a sincronização, dois bodes foram introduzidos junto às fêmeas para a realização das montas naturais. Nesse período, todas as cabras receberam administrações de insulina humana de longa duração (0,2UI/kgPV/dia): as fêmeas do primeiro grupo (Ins.I) (n = 10) foram submetidas à uma única administração de insulina, concomitante à segunda aplicação de cloprostenol (Dia 0); as cabras do segundo grupo (Ins.III) (n = 11) receberam três aplicações de insulina (Dia 0, Dia 3 e Dia 6) e as cabras do terceiro grupo (Ins.IV) (n = 10) foram sujeitas a um total de quatro aplicações (Dia 0, Dia 3, Dia 6 e Dia 9). A prolificidade após o parto foi similar entre grupos ($P > 0,05$), sendo as médias para Ins.I, Ins.III e Ins.IV, respectivamente, de $2,0 \pm 0,4$; $1,6 \pm 0,24$ e $1,6 \pm 0,24$. Em conclusão, administrações simples e repetidas de insulina, antes e após a monta natural, não determinam efeitos distintos sobre a prolificidade de cabras da raça Anglo-Nubiana.

Introduction

In goats, as well as other ruminants, insulin is a crucial key mediator for reproductive performance, and is involved in the follicular development, steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development processes (1). Recent studies reported increasing ovulation rate (1) and viable embryo production in superovulated goats (2) treated with repeated doses of insulin. Moreover, several authors working with cattle suggest that insulin contributes to a better conception rate and to the enhancement of prolificacy (3,4). However, there is no scientific information available in goats. Thus, the aim of this study was investigate the effect of insulin administration on litter size in Anglo-Nubian goats.

Materials and Methods

Thirty-one Anglo-Nubian goats with similar live weight (32.25 ± 0.77 kg; $P > 0.05$) and age (27.9 ± 0.98 months; $P > 0.05$) (mean \pm SEM) had their estrus synchronized by two i.m. administrations of 100 μ g cloprostenol, 11 days apart. Twenty-four hours after the second injection, two fertile Anglo-Nubian bucks were mixed with the goats to detect estrus and mating. In this period, animals were treated subcutaneously with human long acting insulin (0.2IU/kgBW/day). Animals from the first group (Ins.I) (n = 10) were submitted to a unique insulin administration at second cloprostenol injection (Day 0). In second group (Ins.III) (n = 11), females received three insulin administrations (Day 0, Day 3 and Day 6), while the goats of third group (Ins.IV) (n = 10) were treated with four insulin doses (Day 0, Day, 3, Day 6 and Day 9). Immediately after kidding, litter size (litter size/dam that gave birth), type of parturition (simple or multiple) and weight at birth were recorded. All animals were maintained in similar feeding and management conditions. The Insulin effect was analyzed by the SAS GLM procedure. Comparison between Insulin means was performed by the Duncan test and between sexes by *t* test. Values were expressed as mean \pm SEM.

Results and Discussion

Litter size was similar between groups ($P > 0.05$) showing a mean respectively for Ins.I, Ins.III and Ins.IV of 2.0 ± 0.45 , 1.6 ± 0.24 and 1.6 ± 0.24 . These data are not in agreement to (3) that working with cattle, verified that continuous elevations in plasma insulin rates are more

important than the progesterone to the early embryo development and, consequently, to obtain greater prolificacy rates. Other authors (4) reported in lactating dairy cows that IGF-I, positively correlated to the plasma insulin rates, increases embryo survival and, thus, the prolificacy rates. Our findings also show a similar proportion of multiple parturition type ($P > 0.05$) (mean $58.82 \pm 12.30\%$) and for the weight at birth between sex in each group ($P > 0.05$) and among groups in female kids (mean: 2.88 ± 0.06 kg; $P > 0.05$). However, in the male kids Ins.I had a lower weight at birth when compared to Ins.IV (2.77 ± 0.53 kg vs. 3.23 ± 0.16 kg; $P < 0.05$). Based on our results, it was concluded that single or repeated insulin administrations before and after mating did not affect the litter size in Anglo-Nubian goats.

References

- (1) Selvaraju S, Agarwal SK, Karche SD, Srivastava SK, Majumdar AC, Shanker U. 2002. *Anim Reprod Sci*, 73:141-149;
- (2) Souza AL, Galeati G, Almeida AP, Arruda IJ, Govoni N, Freitas VJF, Rondina D. 2008. *Reprod Dom Anim*, 43:218-221;
- (3) Mann GE, Green MP, Sinclair KD, Demmers KJ, Fray MD, Gutierrez CG, Garnsworthy PC, Webb R. 2003. *Anim Reprod Sci*, 79:71-79;
- (4) Block J, Hansen PJ. 2007. *Theriogenology*, 67: 1518-1529.

E-mail: dora.uece@gmail.com

8 CONCLUSÕES GERAIS

Em cabras da raça Anglo-Nubiana, uma única administração de insulina antes da monta natural promove melhores índices de sobrevivência embrionária, com maiores taxas de concepção.

A utilização de repetidas administrações de insulina antes e após a fecundação induz uma significativa redução na sobrevivência do concepto, taxa de concepção, tamanho do placentoma e vesícula embrionária/fetal.

A administração de uma única dose ou de repetidas doses de insulina, antes e após a monta natural, não afeta o tamanho do feto, a frequência de partos múltiplos e a prolificidade ao parto.

9 PERSPECTIVAS

Nossos resultados deixam a perspectiva de que a insulina seja utilizada em campo como uma ferramenta eficaz para aumentar a fertilidade de cabras submetidas à sincronização do estro utilizando duas aplicações de prostaglandina F_{2α}. Além disso, pesquisas adicionais devem ser desenvolvidas a fim de verificar se a administração de uma menor dose de insulina exógena produziria efeitos similares sobre a fertilidade de cabras sincronizadas por esse método.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA, J.A.; RHIND, S.M.; GODDARD, P.J.; MCMILIEN, S.R. Effect of undernutrition on corpus luteum function, jugular and ovarian venous progesterone profiles and endometrial progesterone concentration in sheep. *BSAP Summaries*, Paper No. 80, 1994.

ALI, A.; HAYDER, M. Ultrasonographic assessment of embryonic, fetal and placental development in Ossimi sheep. *Small Ruminant Research* v. 73, p. 277-282, 2007.

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

ASHWORTH, C.J. Maternal factors affecting early pregnancy in sheep. PhD thesis, University of Edinburgh, Edinburgh, UK, 1985.

ASHWORTH, C.J. Effect of pré-mating nutritional status and post-mating progesterone supplementation on embryo survival and conceptus growth in gilts. *Animal Reproduction Science*, v. 26, p. 311, 1991.

ASHWORTH, C.J. Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livestock Production Science*, v. 44, p. 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*, v. 126, p. 91–99, 2003.

AUSTIN, E.J.; MIHM, M.; RYAN, M.P.; WILLIAMS, D.H.; ROCHE, J.F. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. *Journal of Animal Science*, v. 77, p. 2219-2226, 1999.

BALTZ, J.M. Intracellular pH regulation in the early embryo. *BioEssays*, v.15, p. 523-530, 1993.

BALTZ, J.M. Osmoregulation and cell volume regulation in the preimplantation embryo. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 52, p. 55-106, 2001.

BARCROFT, L.C.; OFFENBERG, H.; THOMSEN, P.; WATSON, A.J. Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate trans-epithelial water movements during cavitation. *Developmental Biology*, v. 256, p. 342-354, 2003.

BARRET, D.W.; BARTLEWSKI, P.M.; COOK, S.J.; RAWLINGS, N.C. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF_{2a} given at different stages of the luteal phase in ewes. *Theriogenology* v. 58, p. 1409–1424, 2002.

BASS, J.; OLDHAM, J.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. Growth factors controlling muscle development. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 17, p. 191–197, 1999.

BAZER, F.W. Uterine protein secretions: relationship to development of the conceptus. *Journal of Animal Science*, v. 41, p. 1376-1382, 1975.

BECH-SÀBAT, G.; LÓPEZ-GATIUS, F.; YÁNIZ, J.L.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; SANTOLARIA, P.; SERRANO, B.; SULON, J.; SOUSA, N.M.; BECKERS, J.F. Factors affecting plasma progesterone in the early fetal period in high producing dairy cows. *Theriogenology*, v. 69, p. 426-432, 2008.

BENOS, D.; BIGGERS, J.D. Blastocyst fluid formation. In: *Fertilization and Embryonic Development In vitro*. L Mastroianni Jr and JD Biggers (Eds), New York, Plenum Press, p. 283-297, 1981.

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 β -estradiol in bovine females. *Biology of Reproduction*, v. 54, p. 546-553, 1996.

BHATNAGAR, P.; PAPAIOANNOU, V.E.; BIGGERS, J.D. CSF-1 and mouse preimplantation development in vitro. *Development*, v. 121, p. 1333-1339, 1995.

BIGGERS, J.D.; BELL, J.E.; BENOS, D.J. Mammalian blastocyst: transport functions in a developing epithelium. *American Journal of Physiology*, v. 255, p. 419-432, 1988.

BLOCK, J.; HANSEN, P.J. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of in vitro produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology*, v. 67, p. 1518-1529, 2007.

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

BREUEL, K.F.; FUKUDA, A.; SCHRICK, F.N. Effects of prostaglandin F₂ α on development of 8-cell rat embryos in vitro. *Biology of Reproduction*, v. 48, p. 173, 1993.

BRICE, E.C.; WU, J.X.; MURARO, R.; ADAMSON, E.D.; WILEY, L.M. Modulation of mouse preimplantation development by epidermal growth factor receptor antibodies, antisense RNA, and deoxyoligonucleotides. *Developmental Genetics*, v. 14, p. 174-184, 1993.

BUFORD, W.I.; AHMAD, N.; SCHRICK, F.N.; BUTCHER, R.L.; LEWIS, P.E.; INSKEEP, E.K. Embryotoxicity of a regressing corpus luteum in beef cows supplemented with progestogen. *Biology of Reproduction*, v. 54, p. 531-537, 1996.

BURTON, G.J.; WATSON, A.L.; HEMPSTOCK, J.; SKEPPER, J.N.; JAUNIAUX, E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 87, p. 2952-2959, 2002.

BUTLER, W.R. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 2533-2539, 1998.

CARAYANNOPOULOS, M.; CHI, M.; CUI, Y.; PINGSTERHAUS, J.; MOLEY, K. GLUT8, a glucose transporter responsible for insulin-stimulated uptake in the blastocyst. *Proceeding National Academy Science USA*, v. 97, p. 1421-1424, 2000.

CARAYANNOPOULOS, M.O.; SCHLEIN, A.; WYMAN, A.; CHI, M.; KEEMBIYEHETTY, C.; MOLEY, K.H. GLUT9 is differentially expressed and targeted in the preimplantation embryo. *Endocrinology*, v. 145, p. 1435-1443, 2004.

CHI, M.M.Y.; SCHLEIN, A.L.; MOLEY, K.H. High insulin-like growth factor I (IGF-I) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-I receptor. *Endocrinology* v. 141, p. 4784-4792, 2000.

COOPER, D.A.; CARVER, D.A.; VILLENEUVE, P.; SILVIA, W.J. Effects of progestagen treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 91, p. 411-421, 1991.

Crump Institute for Biological Imaging. Esquema ilustrativo do desenvolvimento embrionário durante o período de pré-implantação. Disponível em <<http://web.cena.usp.br>>. Acesso em: 23 dezembro 2008.

DALBIÉS-TRAN, R.; MERMILLOD, P. Use of heterologous complementary DNA array screening to analyze bovine oocyte transcriptome and its evolution during in vitro maturation. *Biology of Reproduction*, v.68(1), p.252-261, 2003.

DARDIK, A.; SCHULTZ, R.M. Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: stimulatory effect of TGF- α and EGF. *Development*, v. 113, p. 919-930, 1991.

DARDIK, A.; SMITH, R.M.; SCHULTZ, R.M. Colocalization of transforming growth factor- α and a functional epidermal growth factor receptor (EGFR) to the inner cell mass and preferential localization of the EGFR on the basolateral surface of the trophectoderm in the mouse blastocyst. *Developmental Biology*, v. 154, p. 396-409, 1992.

DAVIS, W.; DE SOUSA, P.A.; SCHULTZ, R.M. Transient expression of translation initiation factor eIF-4C during the 2-cell stage of the preimplantation mouse embryo: identification by mRNA differential display and the role of DNA replication in zygotic gene activation. *Developmental Biology*, v. 174, p. 190-201, 1996.

DE HERTOIGH, R.; VANDERHEYDEN, I.; PAMPFER, S.; ROBIN, D.; DELCOURT, J. Maternal insulin treatment improves pre-implantation embryo development in diabetic rats. *Diabetologia*, v. 35, p. 406-408, 1992.

DEMMERS, K.J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction*, v. 121, p. 41-49, 2001.

DISKIN, M.G.; STRONGE, A.J.H.; MORRIS, D.G.; KENNY, D.A.; SREENAN, J.M. The association between early luteal phase concentrations of progesterone and embryo survival in heifers and dairy cows. *Journal of Animal Science*, v. 82, p. 101, 2004.

DONNAY, I.; LEESE, H.J. Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Molecular Reproduction and Development*, v. 53, p. 171-178, 1999.

DOWNING, J.A.; JOSS, J.; SCARAMUZZI, R.J. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophins and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrous cycle. *Journal of Endocrinology*, v. 146, p. 403-410, 1995.

DUNGLISON, G.F.; JANE, S.D.; MACCAUL, T.F.; CHAD, J.E.; FLEMING, T.P.; KAYE, P.L. Stimulation of endocytosis in mouse blastocysts by insulin: a quantitative morphological analysis. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 105, p. 115-123, 1995.

DUNNE, L.D.; DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Animal Reproduction Science*, v. 58, p. 39-44, 2000.

EALY, A.D.; WAGNER, S.K.; SHEILS, A.E.; WHITLEY, N.C.; KIESLING, D.O.; JOHNSON, S.E.; BARBATO, G.F. Identification of Interferon- τ isoforms expressed by the peri-

implantation goat (*Capra hircus*) conceptus. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 27, p. 39-49, 2004.

EDWARDS, L.J.; WILLIAMS, D.A.; GARDNER, D.K. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acid acts as buffers of intracellular pH. *Human Reproduction*, v. 13, p. 3441-3448, 1998.

EPSTEIN, C.J.; SMITH, S.A. Amino acid uptake and protein synthesis in preimplantation mouse embryos. *Developmental Biology*, v. 33, p. 171-184, 1973.

FABIAN, D.; IL'KOVA, G.; REHAK, P.; CZIKKOVA, S.; BARAN, V.; KOPPEL, J. Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured in vitro. *Theriogenology*, v. 61, p. 745-755, 2004.

FERNANDEZ-MORO, D.; VEIGA-LOPEZ, A.; ARIZNAVARRETA, C.; TRESGUERRES, J.A.F.; ENCINAS, T.; GONZALEZ-BULNES, A. Preovulatory Follicle Development in Goats Following Oestrous Synchronization with Progestagens or Prostaglandins. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 9-14, 2008.

FLECHON, J.E.; GUILLOMOT, M.; CHARLIER, M.; FLECHON, B.; MARTAL, J. Experimental studies on the elongation of the ewe blastocyst. *Reproduction, Nutrition and Development*, v. 26, p. 1017-1024, 1986.

FLEMING, T.P.; GHASSEMIFAR, M.R.; SHETH, B. Junctional complexes in the early mammalian embryo. *Seminars in Reproductive Medicine*, v. 18, p. 185-193, 2000.

FLEMING, J.A.; CHOI, Y.; JOHNSON, G.A.; SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Cloning of the ovine estrogen receptor-alpha promoter and functional regulation by ovine interferon-tau. *Endocrinology*, v. 142, p. 2879-2887, 2001.

FOWDEN, A. Endocrine regulation of fetal growth. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, p. 351-363, 1995.

FREI, R.E.; SCHULTZ, G.A.; CHURCH, R.B. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16 cell stage of embryo genesis in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 86, p. 637-641, 1989.

FUKAYA, T.; YAMANAKA, T.; TERADA, Y.; MURAKAMI, T.; YAJIMA, A. Growth hormone improves mouse embryo development in vitro and the effect is neutralized by growth hormone receptor antibody. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, v. 184, p. 113-122, 1998.

GARCIA-ARAGON, J.; LOBIE, P.E.; MUSCAT, G.E.; GOBIUS, K.S.; NORSTEDT, G.; WATERS, M.J. Prenatal expression of the growth hormone (GH) receptor/binding protein in the rat: a role for GH in embryonic and fetal development? *Development*, v. 114, p. 869-876, 1992.

GARDNER, D.K. Embryo development and culture techniques. In: *New Technologies in Animal Breeding*, Clark J (Ed), Harwood Academic, Berkshire, 1997.

GARDNER, D.K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, v. 49, p. 83-103, 1998.

GARDNER, R.L.; JOHNSON, M.H. Investigation of cellular interaction and deployment in the early mammalian embryo using interspecific chimaeras between the rat and mouse. *Ciba Foundation Symposium*, v. 29, p. 183-200, 1975.

GARDNER, H.G.; KAYE, P.L. Insulin increases cell numbers and morphological development in mouse pre-implantation embryos in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 3, p. 79-91, 1991.

GARRETT, J.E.; GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T.; MORGAN, G.L. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 84, p. 437-446, 1988.

GLISTER, C.; TANNETTA, D.S.; GROOME, N.P.; KNIGHT, P.G. Interactions Between Follicle-Stimulating Hormone and Growth Factors in Modulating Secretion of Steroids and Inhibin-Related Peptides by Nonluteinized Bovine Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 1020-1028, 2001.

GOFF, A.K. Embryonic Signals and Survival. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 37, p. 133-139, 2002.

GONG, J.G. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 23, p. 229-241, 2002.

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

GONZALEZ-BULNES, A.; VEIGA-LOPEZ, A.; GARCIA, P.; GARCIA-GARCIA, R.M.; ARIZNAVARRETA, C.; SANCHEZ, M.A.; TRESGUERRES, J.A.F.; COCERO, M.J.; FLORES, J.M. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology*, v. 63, p. 2523–2534, 2005.

GOPICHANDRAN, N.; LEESE, H.J. Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. *Reproduction*, v. 126, p. 299-308, 2003.

GRAY, C.A.; BARTOL, F.F.; TARLETON, B.J.; WILEY, A.A.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. Developmental biology of uterine glands. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 1311-1323, 2001a.

GRAY, C.A.; TAYLOR, K.M.; RAMSEY, W.S.; HILL, J.R.; BAZER, F.W.; BARTOL, F.F.; SPENCER, T.E. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 1608-1613, 2001b.

GRAY, C.A.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromise conceptus survival and elongation. *Reproduction*, v. 124, p. 289-300, 2002.

GREEN, M.P.; HUNTER, M.G.; MANN, G.E. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 88, p. 179–189, 2005.

GROTHEY, A.; VOIGT, W.; SCHOBER, C.; MULLER, T.; DEMPKE, W.; SCHMOLL, H.J. The role of insulin-like growth factor-I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 125, p. 166-173, 1999.

GUILLOMOT, M.; FLECHON, J.E.; WINTENBERGER-TORRES, S. Conceptus attachment in the ewe: an ultrastructural study. *Placenta*, v. 2, p. 169-182, 1981.

GUTIERREZ, C.G.; CAMPBELL, B.K.; WEBB, R. Development of a longterm bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle stimulating hormone and morphological characteristics. *Biology of Reproduction*, v. 56, p. 608–616, 1997.

GWATKIN, R.B.L. Amino acid requirements for attachment and outgrowth of the mouse blastocyst in vitro. *Journal of Cell Comparative Physiology*, v.68, p. 335-344, 1966.

HARDY, K.; SPANOS, S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *Journal of Endocrinology*, v. 172, p. 221-236, 2002.

HARNEY, J.P.; OTT, T.L.; GEISERT, R.D.; BAZER, F.W. Retinol-binding protein gene expression in cyclic and pregnant endometrium of pigs, sheep and cattle. *Biology of Reproduction*, v. 49, p. 1066-1073, 1993.

HARPER, M.J.K.; SKARNES, R.C. Inhibition of abortion and fetal death produced by endotoxin or prostaglandin F_{2α}. *Prostaglandins*, v. 2, p. 295-309, 1972.

HARVEY, A.J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Animal Reproduction Science*, v. 98, p. 113-128, 2007.

HARVEY, M.B.; KAYE, P.L. Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryos. *Endocrinology*, v. 122, p. 1182-1184, 1988.

HARVEY, M.B.; KAYE, P.L. Insulin increases the cell number of inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocyst in vitro. *Development*, v. 110, p. 963-967, 1990.

HARVEY, M.B.; KAYE, P.L. Insulin-like growth factor-I stimulates growth of mouse preimplantation embryos in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v. 31, p. 195-199, 1992a.

HARVEY, M.B.; KAYE, P.L. IGF-II stimulates growth and metabolism of early mouse embryos. *Mechanisms of Development*, v. 38, p. 169-173, 1992b.

HARVEY, M.B.; KAYE, P.L. Mediation of the actions of insulin and insulin-like growth factor-I on preimplantation mouse embryos in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v. 33, p. 270-275, 1992c.

HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; PANTALEON, M.; ARMSTRONG, D.T.; THOMPSON, J.G. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biology of Reproduction*, v. 71, p. 1108-1119, 2004.

HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; SAYRE, B.L.; BUTCHER, R.L.; INSKEEP, E.K. Embryotoxic effects adjacent and opposite to the early regressing bovine corpus luteum. *Theriogenology*, v. 54, p. 83-91, 2000.

HERNANDEZ-LEDEZMA, J.J.; MATHIALAGAN, M.; VILLANUEVA, C.; SIKES, J.D.; ROBERTS, R.M. Expression of bovine trophoblast interferons by in vitro-derived

blastocysts is correlated with their morphological quality and stage of development. *Molecular Reproduction and Development*, v. 36, p. 1-6, 1993.

HERRLER, A.; KRUSCHE, C.A.; BEIER, H.M. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biology of Reproduction*, v. 59 p. 1302–1310, 1998.

HEYNER, S.; RAO, L.V.; JARETT, L.; SMITH, R.M. Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis: pattern of uptake and functional correlations. *Developmental Biology*, v. 134, p. 48-58, 1989.

HOSSNER, K.L.; MCCUSKER, R.H.; DODSON, M.V. Insulin-like growth factors and binding proteins in domestic animals. *Animal Science*, v. 64, p. 1–15, 1997.

HOUGHTON, F.D.; THOMPSON, J.G.; KENNEDY, C.J.; LEESE, H.J. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Molecular Reproduction and Development*, v. 44, p. 476–485, 1996.

INSKEEP, E.K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal of Animal Science*, v. 82, p. 24-39, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Produção Pecuária Municipal*. Rio de Janeiro: IBGE, v. 48, p. 62, 2006.

IZADYAR, F.; VAN TOL, H.T.; HAGE, W.G.; BEVERS, M.M. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during in vitro development. *Molecular Reproduction and Development*, v. 57, p. 247-255, 2000.

JAINUDEEN, M.R.; HAFEZ, E.S.E. Gestation, prenatal physiology and parturition. Hafez ESE. (Ed.), *Reproduction in Farm Animals*, 7th ed. Lea and Febiger, Philadelphia, p. 148, 2000.

JINDAL, R.; COSGROVE, J.; AHERNE, F.; FOXCROFT, G. Effect of nutrition on embryo mortality in gilts, association with progesterone. *Journal of Animal Science*, v. 74, p. 620-624, 1996.

JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; JOYCE, M.M.; SPENCER, T.E.; BAZER, F.W.; PFARRER, C.; GRAY, C.A. Osteopontin expression in uterine stroma indicates a decidualization–like differentiation during ovine pregnancy. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 1951-1958, 2003.

JUNG, Y.G.; SAKATA, T.; LEE, E.S.; FUKUI, Y. Amino acid metabolism of bovine blastocysts derived from parthenogenetically activated or in vitro fertilized oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 10, p. 279-287, 1998.

JURISICOVA, A. Expression and regulation of genes of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, v. 51(3), p. 243-253, 1998.

KANKA, J. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. *Theriogenology*, v. 59, p. 3-19, 2003.

KAYE, P.L. Preimplantation growth factor physiology. *Reviews of Reproduction*, v. 2, p. 121-127, 1997.

KAYE, P.L.; BELL, K.L.; BEEBE, L.F.; DUNGLISON, G.F.; GARDNER, H.G.; HARVEY, M.B. Insulin and the insulin-like growth factors (IGFs) in preimplantation development. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 4, p. 373-386, 1992.

KAYE, P.L.; HARVEY, M.B. The role of growth factors in preimplantation development. *Progress in Growth Factor Research*, v. 6, p. 1-24, 1995.

KEMLER, R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genetic*, v. 9, p. 317-321, 1993.

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*, v. 47, p. 703-714, 1997.

KIM, J.J.; FUNAHASHI, H.; NIWA, K.; OKUDA, K. Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilised bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology*, v. 39, p. 875-886, 1993.

KLEMPT, M.; BINGHAM, B.; BREIER, B.H.; BAUMBACH, W.R.; GLUCKMAN, P.D. Tissue distribution and ontogeny of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and ligand binding to hepatic tissue in the midgestation sheep fetus. *Endocrinology*, v. 132, p. 1071-1077, 1993.

KO, Y.; YOUNG LEE, C.; OTT, T.L.; DAVIS, M.A.; SIMMEN, R.C.M.; BAZER, F.W.; SIMMEN, F.A. Insulin-like growth factor in sheep uterine fluids: concentrations and relationship to ovine trophoblast protein-1 production during early pregnancy. *Biology of Reproduction*, v. 45, p. 135-142, 1991.

KOLLE, S.; STOJKOVIC, M.; PRELLE, K.; WATERS, M.; WOLF, E.; SINOWATZ, F. Growth hormone (GH)/GH receptor expression and GH-mediated effects during early bovine embryogenesis. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 1826-1834, 2001.

KOLLE, S.; STOJKOVIC, M.; BOIE, G.; WOLF, E.; SINOWATZ, F. Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, p. 180-186, 2002.

KUSINA, N.T.; TARWIREI, H.; HAMUDIKUWANDA, H.; AGUMBA, G.; MUKWENA, J. A comparison of the effects of progesterone sponges and ear implants, PGF 2α , and their combination on efficacy of estrus synchronization and fertility of Mashona goat does. *Theriogenology*, v. 53, p. 1567–1580, 2000.

Laboratoire de Biologie de la Reproduction. Embrião no estágio de blastocisto, aproximadamente no dia 5 de desenvolvimento; Diferentes estádios do desenvolvimento embrionário durante o período de pré-implantação. Disponível em <<http://www.embryology.ch>>. Acesso em: 23 dezembro 2008.

LACROIX, M.C.; DEVINOY, E.; CASSY, S.; SERVELY, J.L.; VIDAUD, M.; KANN, G. Expression of growth hormone and its receptor in the placental and feto-maternal environment during early pregnancy in sheep. *Endocrinology*, v. 140, p. 5587-5597, 1999.

LATHAM, K.E.; SCHULTZ, R.M. Embryonic genomic activation. *Frontiers Bioscience*, v. 6, p. 748-759, 2001.

LEE, Y.; LEE, O.; CHO, J.; SHIN, H.; CHOI, Y.; SRIM, Y.; CHOI, W.; SHIN, H.; LEE, D.; LEE, G.; SHIN, S. Ultrasonic measurement of fetal parameters for estimation of gestational age in Korean black goats. *Journal of Veterinary Medical Science* 67, 497–502, 2005.

LEESE, H.J. Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Human Reproduction Update*, v. 1, p. 63–72, 1995.

LEROY, J.L.M.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; GOOVAERTS, I.G.F.; BOLS, P.E.J. 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, p. 612-622, 2008.

LIGHTEN, A.D.; HARDY, K.; WINSTON, R.M.; MOORE, G.E. Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v. 47, p. 134-139, 1997.

LIM, J.J.; 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. *Human Reproduction*, v. 14, p. 458-464, 1999.

LINDENBAUM, A. A survey of naturally occurring chelating ligands. *Advances in Experimental Medical Biochemistry*, v. 40, p. 67-77, 1973.

LOK, F.; OWENS, J.A.; MUNDY, L.; ROBINSON, J.S.; OWENS, P.C. Insulin like growth factor I promotes growth selectively in fetal sheep in late gestation. *American Journal of Physiology*, v. 270, p. 1148–1155, 1996.

LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PINTADO, B.; FAIR, T.; WARD, F.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptors, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Develop* 57, 146–152., 2000.

LOPES, A.S.; LARSEN, L.H.; RAMSING, N.; LOVENDAHL, P.; RATY, M.; PEIPPO, J. Respiration rates of individual bovine in vitro-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system. *Reproduction*, v. 130, p. 669-679, 2005.

MACMILLAN, K.L.; TAUFAN, V.K.; DAY, A.M. Effects of an agonist of gonadotropin releasing hormone (Buserelin) in cattle III. Pregnancy rates after a post-insemination injection during metoestrus or dioestrus. *Animal Reproduction Science*, v. 11, p. 1-10, 1986.

MAKAREVICH, A.V.; MARKKULA, M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 386–392, 2002.

MALAYER, J.R.; HANSEN, P.J.; GROSS, T.S.; THATCHER, W.W. Regulation of heat shock-induced alterations in the release of prostaglandins by the uterine endometrium of cows. *Theriogenology*, v. 34, p. 219-230, 1990.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Effects of treatment with Buserelin on plasma concentrations of estradiol and progesterone and cycle length in the cow. *British Veterinary Journal*, v. 151, p. 427-432, 1995.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 34, p. 269–274, 1999.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Relationship between the maternal endocrine environment, early embryo development and the inhibition of the luteolytic mechanism in the cow. *Reproduction*, v. 121, p. 175-180, 2001.

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. *Animal Reproduction Science*, v. 79, p. 71–79, 2003.

MARKHAM, K.E.; KAYE, P.L. Growth hormone, insulin-like growth factor-I and cell proliferation in the mouse blastocyst. *Reproduction*, v. 125, p. 327-336, 2003.

MARTINEZ, M.F.; BOSCH, P.; BOSCH, R.A. Determination of early pregnancy and embryonic growth in goat by transrectal ultrasound scanning. *Theriogenology* v. 49, p. 1555–1565, 1998.

MATSUI, M.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized in vitro. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 57, p. 1109-1111, 1995.

MAURER, R.R.; BEIER, H.M. Uterine proteins and development in vitro of rabbit preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 48, p. 33-41, 1976.

MCDONALD, L.L.; NICHOLS, R.E.; MCNUTT, S.H. Study of corpus luteum ablation and progesterone replacement therapy in the cow. *American Journal of Veterinary Research*, v. 13, p. 446-451, 1952.

MCGOWAN, K.M.; LONG, S.D.; PEKALA, P.H. Glucose transporter gene expression: regulation of transcription and mRNA stability. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 66, p. 465-505, 1995.

MEISTERLING, E.M.; DAILEY, R.A. Use of concentrations of progesterone and estradiol-17 β in milk in monitoring postpartum ovarian function in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 70, p. 2154-2161, 1987.

MEMILI, E.; FIRST, N.L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression compared with others species. *Zygote*, v. 8(1), p. 87-96, 2000.

MENDOZA, C.; CREMADES, N.; RUIZ-REQUENA, E.; MARTINEZ, F.; ORTEGA, E.; BERNABEU, S.; TESARIK, J. Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection and intrafollicular steroid pituitary hormone and cytokine concentrations. *Human Reproduction*, v. 14, p. 628-635, 1999.

MIHALIK, J.; REHAK, P.; KOPPEL, J. The influence of insulin on the in vitro development of mouse and bovine embryos. *Physiology Research*, v. 49, p. 347-354, 2000.

MIHM, M.; CURRAN, N.; HYTTEL, P.; KNIGHT, P.G.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 116, p. 293-304, 1999.

MOLEY, K.H.; CHI, M.-Y.; KNUDSON, C.M.; KORSMEYER, S.J.; MUECKLER, M.M. Hyperglycemia induces apoptosis in preimplantation embryos via cell death effector pathways. *Nature Medicine*, v. 12, p. 1421-1424, 1998.

MONTAG, M.; KOLL, B.; HOLMES, P.; VAN DER VEN, H. Significance of the number of embryonic cells and the state of the zona pellucida for hatching of mouse blastocysts in vitro versus in vivo. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 1738-1744, 2000.

MOSES, D.F.; MATKOVIC, M.; CABRERA FISHER, E.; MARTINEZ, A.G. Amino acid contents of oviductal and uterine fluids. *Theriogenology*, v. 47, p. 336, 1997.

NAGAOKA, K.; SAKAI, A.; NOJIMA, H.; SUDA, Y.; YOKOMIZO, Y.; IMAKAWA, K. A chemokine, interferon (IFN)-gamma-inducible protein 10kDa, is stimulated by IFN-tau and recruits immune cells in the ovine endometrium. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 1413-1421, 2003.

NUTI, L.C.; BRETZLAFF, K.N.; ELMORE, R.G.; MEYERS, S.A.; RUGILA, J.N.; BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; WESTON, P.G. Synchronization of estrus in dairy goats treated with prostaglandin F_{2α} at various stages of the estrous cycle. *American Journal of Veterinary Research*, v. 53, p. 935-937, 1992.

O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M.P. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Animal Science*, v. 68, p. 299-314, 1999.

OHLSSON, C.; LOVSTEDT, K.; HOLMES, P.V.; NILSSON, A.; CARLSSON, L.; TORNELL, J. Embryonic stem cells express growth hormone receptors: regulation by retinoic acid. *Endocrinology*, v. 133, p. 2897-2903, 1993.

OSGERBY, J.C.; GADD, T.S.; WATHES, D.C. The effect of maternal nutrition and body condition on placental and foetal growth in the ewe. *Placenta* v. 24, p. 236–47, 2003.

OTT, T.L.; YIN, J.; WILEY, A.A.; KIM, H.T.; GERAMI-NAINI, B.; SPENCER, T.E. Effects of the estrous cycle and early pregnancy on uterine expression of Mx protein in sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 784-794, 1998.

PALMA, G.A.; MULLER, M.; BREM, G. Effect of insulin-like growth factor-I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 110, p. 347-353, 1997.

PALME, R.; FISCHER, P.; SCHILDORFER, H.; ISMAIL, M.N. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via feces and urine in domestic livestock. *Animal Reproduction Science*, v. 43, p. 43-63, 1996.

PANTALEON, M.; HARVEY, M.B.; PASCOE, W.S.; JAMES, D.E.; KAYE, P.L. Glucose transporter GLUT3: ontogeny, targeting and role in the mouse blastocyst. *Proceeding National Academy Science USA*, v. 94, p. 3795-3800, 1997a.

PANTALEON, M.; WHITESIDE, E.J.; HARVEY, M.B.; BARNARD, R.T.; WATERS, M.J.; KAYE, P.L. Functional growth hormone (GH) receptors and GH are expressed by preimplantation mouse embryos: a role for GH in early embryogenesis? *Proceedings National Academy of Sciences USA*, v. 94, p. 5125-5130, 1997b.

PARR, R.A. Nutrition-progesterone interaction during early pregnancy in sheep. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 4, p. 297-300, 1992.

PARR, R.A.; DAVIS, F.F.; FAIRCLOUGH, R.J.; MILES, M.A. Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 80, p. 317-320, 1987.

PARTRIDGE, R.J.; LEESE, H.J. Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 8, p. 945-950, 1996.

PAUKEN, C.M.; CAPCO, D.G. Regulation of cell adhesion during embryonic compaction of mammalian embryos: roles for PKC and beta-catenin. *Molecular Reproduction and Development*, v. 54, p. 135-144, 1999.

PECLARIS, G.N.; KOUTSOTOLIS, K.; SEFERIADIS, K.; MANTZIOS, A.; NIKOLAOU, E.; KOLIOS, G. Effect of monensin and progesterone priming on ram-induced

reproductive performance of Boutsikiko mountain breed ewes. *Theriogenology* v. 51, p. 531–540, 1999.

PELTIER, M.R.; HANSEN, P.J. Immunoregulatory activity, biochemistry, and phylogeny of ovine uterine serpin. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 45, p. 266-272, 2001.

PINTO, A.B.; SCHLEIN, A.L.; MOLEY, K.H. Preimplantation exposure to high insulin-like growth factor I concentrations results in increased resorption rates in vivo. *Human Reproduction*, v. 17, p. 457-462, 2002.

PONTZER, C.H.; TORRES, B.T.; VALLET, J.L.; BAZER, F.W.; JOHNSON, H.M. Antiviral activity of the pregnancy recognition hormone ovine trophoblast protein-1. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 152, p. 801-807, 1988.

PONTZER, C.H.; BAZER, F.W.; JOHNSON, H.M. Antiproliferative activity of a pregnancy recognition hormone, ovine trophoblast protein-1. *Cancer Research*, v. 51, p. 5304-5307, 1991.

PRATT, H.P. Membrane organization in the preimplantation mouse embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, v. 90, p. 101-121, 1985.

PRITCHARD, J.Y.; SCHRICK, F.N.; INSKEEP, E.K. Relationship of pregnancy rate to peripheral concentrations of progesterone and estradiol in beef cows. *Theriogenology*, v. 42, p. 247-259, 1994.

RABIEE, A.R.; MACMILLAN, K.L.; SCHWARZENBERGER, F. The effect of level of feed intake on progesterone clearance rate by measuring faecal progesterone metabolites in grazing dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 67, p. 205-214, 2001a.

RABIEE, A.R.; MACMILLAN, K.L.; SCHWARZENBERGER, F. Progesterone metabolism in ovariectomised non-lactating Holstein-Friesian cows treated with progesterone with two levels of feed intake. *Animal Reproduction Science*, v. 66, p. 35-46, 2001b.

RABIEE, A.R.; MACMILLAN, K.L.; SCHWARZENBERGER, F.; WRIGHT, P.J. Effects of level of feeding and progesterone dose on plasma and faecal progesterone in ovariectomised cows. *Animal Reproduction Science*, v. 73, p. 185-195, 2002a.

RABIEE, A.R.; DALLEY, D.; BORMAN, J.M.; MACMILLAN, K.L.; SCHWARZENBERGER, F. Progesterone clearance rate in lactating dairy cows with two levels of dry matter and metabolisable energy intakes. *Animal Reproduction Science*, v. 72, p. 11-25, 2002b.

RAPOLEE, D.A.; STURM, K.S.; BEHRENDTSEN, O.; SCHULTZ, G.A. PEDERSEN, R.A.; WERB, Z. Insulin-like growth factor II acts through and endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos. *Genes and Development*, v. 6, p. 939-952, 1992.

RESNICOFF, M.; ABRAHAM, D.; YUTANAWIBOONCHAI, W.; ROTMAN, H.L.; KAJSTURA, J; RUBIN, R. The insulin-like growth factor-I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. *Cancer Research*, v. 55, p. 2463-2469, 1995.

REYNOLDS, T.S.; STEVENSON, K.R.; WATHES, D.C. Pregnancy-specific alterations in the expression of the insulin-like growth factor system during early placental development in the ewe. *Endocrinology*, v. 138, p. 886–897, 1997.

RHIND, S.M.; LESLIE, I.D.; GUNN, R.G. Plasma FSH, LH, prolactin and progesterone profiles of Cheviot ewes with different levels of intake before and after mating, and associated effects on reproductive performance. *Animal Reproduction Science*, v.8, p. 301-313, 1985.

RILEY, J.K.; MOLEY, K.H. Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. *Reproduction*, v. 131, p.823-835, 2006.

ROBERTSON, S.A.; SJOBLUM, C.; JASPER, M.J.; NORMAN, R.J.; SEAMARK, R.F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 1206-1215, 2001.

ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; LAMMING G.E.; WATHES, D.C. The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. *Journal of Endocrinology*, v. 160, p. 21-33, 1999.

ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; GADD, T.S.; LAMMING, G.E.; WATHES, D.C. The expression of the IGF-I system in the bovine uterus throughout the oestrous cycle and early pregnancy. *Journal of Endocrinology*, v. 165, p. 231-243, 2000.

ROBINSON, J.J.; ROOKE, J.A.; MCEVOY, T.G. Nutrition for conception and pregnancy. In: Freer, M., Dove, H. (Eds.), *Sheep Nutrition*. CAB International, Wallingford, UK, p. 189–211, 2002.

ROBINSON, J.J; ASHWORTH, C. J.; ROOKE, J.A.; MITCHELL, L.M.; MCEVOY, T.G. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Animal Feed Science and Technology*, v. 126, p. 259-276, 2006.

RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F.; SPINACI, M.; GALEATI, G. Effect of Nutrition on Plasma Progesterone Levels, Metabolic Parameters and Small Follicles Development in Unstimulated Goats Reared Under Constant Photoperiod Regimen. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 40, p. 548-552, 2005.

ROYAL, M.; MANN, G.E.; FLINT, A.P.F. Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, v. 160, p. 53-60, 2000.

RUBIO, J.M.; HALLFORD, D.M.; HAWKINS, D.E. Effect of glucose administration during estrous cycle on serum hormone profiles, mRNA for steroidogenic enzymes, and breeding performance of ewes. *Journal of Animal Science*, v. 75, p. 775-780, 1997.

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

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D.K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L.E.; WILTBANK, M.C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 2831-2842, 2002.

SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W.; CHEBEL, R.C.; CERRI, R.L.A.; GALVÃO, K.N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 513-535, 2004.

SASAKI, S. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. *Animal Science Journal*, v. 73, p. 423-433, 2002.

SCENNA, F.N.; EDWARDS, J.L.; ROHRBACH, N.R.; HOCKETT, M.E.; SAXTON, A.M.; SHRICK, F.N. Detrimental effects of prostaglandin F2 α on preimplantation bovine embryos. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, v. 73, p. 215-226, 2004.

SCHRAMM, W.; BOVAIRD, L.; GLEW, M.E.; SCHRAMM, G.; McCRACKEN, J.A. Corpus luteum regression induced by ultra-low pulses of prostaglandin F2 α . *Prostaglandins*, v. 26, p. 347-364, 1983.

SCHRICK, F.N.; INSKEEP, E.K.; BUTCHER, R.L. Pregnancy rates for embryos transferred from early postpartum beef cows into recipients with normal estrous cycles. *Biology of Reproduction*, v. 49, p. 617-621, 1993.

SCHULTZ, R.M. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *BioEssays*, v. 15, p. 531-538, 1993.

SCHWARZENBERGER, F.; PALME, R.; BAMBERG, E.; MOSTL, E. A review of faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in mammals. *International Journal of Mammalian Biology*, v. 62 (Suppl. II), p. 214-221, 1997.

SELLENS, M.H.; STEIN, S.; SHERMANN, M.I. Protein and free amino-acid content in pre-implantation mouse embryos and in blastocysts under various culture conditions. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 61, p. 307-351, 1981.

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. *Animal Reproduction Science*, v. 73, p. 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 insulin. *Theriogenology* v. 59, p. 1459-1468, 2003.

SHAHAM-ABALANCY, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; ROSENBERG, M.; WOLFESON, D. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF₂ α secretion in the subsequent oestrus cycle. *Reproduction*, v. 122, p. 643-648, 2001.

SHI, C.Z.; COLLINS, H.W.; BUETTGER, C.W.; GARSIDE, W.T.; MATSCHINSKY, F.M.; HEYNER, S. Insulin family growth factors have specific effects on protein synthesis in preimplantation mouse embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v. 37, p. 398-406, 1994.

SILVA, P.J.; JUENGEL, J.L.; ROLLYSON, M.K.; NISWENDER, G.D. Prostaglandin metabolism in the ovine corpus luteum: catabolism of prostaglandin F₂ α (PGF₂ α) coincides with resistance of the corpus luteum to PGF₂ α . *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 1229-1236, 2000.

SINCLAIR, K.D.; KURAN, M.; GEBBIE, F.E.; WEBB, R.; MCEVOY, T.B. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *Journal of Animal Science*, v. 78, p. 2670-2689, 2000.

SIRISATHIEN, S.; HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; BRACKETT, B.G. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. *Animal Reproduction Science*, v. 77, p. 21-32, 2003.

SMITH, R.M.; GARSIDE, W.T.; AGHAYAN, M.; SHI, C.Z.; SHAH, N.; JARETT, L.; HEYNER, S. Mouse preimplantation embryos exhibit receptor-mediated binding and transcytosis of maternal insulin-like growth factor I. *Biology of Reproduction*, v. 49, p. 1–12, 1993.

SOUZA, A.L.; GALEATI, G.; ALMEIDA, A.P.; ARRUDA, I.J.; GOVONI, N.; FREITAS, V.J.F.; RONDINA, D. Embryo Production in Superovulated Goats Treated with Insulin Before or After Mating or by Continuous Propylene Glycol Supplementation. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 218-221, 2008.

SPANOS, S.; BECKER, D.L.; WINSTON, R.M.; HARDY, K. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 1413-1420, 2000.

SPENCER, T.E.; GRAY, A.; JOHNSON, G.A.; TAYLOR, K.M.; GERTLER, A.; GOOTWINE, E.; OTT, T.L.; BAZER, F.W. Effects of recombinant ovine interferon tau, placental lactogen, and growth hormone on the ovine uterus. *Biology of Reproduction*, v. 61, p. 1409-1418, 1999.

SPENCER, T.E.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 537-550, 2004.

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 Publication, v. 26, p. 93-104, 2001.

STANTON, J.A.; MACGREGOR, A.B.; GREEN, D.P. Gene expression in the mouse preimplantation embryo. *Reproduction*, v. 125, p. 457-468, 2003.

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 Publication, v.26, p.447-450, 2001.

STEWART, M.D.; JOHNSON, G.A.; GRAY, C.A.; BURGHARDT, R.C.; SCHULER, L.A.; JOYCE, M.M.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. Prolactin receptor and uterine milk protein expression in the ovine endometrium during the estrous cycle and pregnancy. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 1779-1789, 2000.

SUMMERS, S.A.; YIN, V.P.; WHITEMAN, E.L.; GARZA, L.A.; CHO, H.; TUTTLE, R.L.; BIRNBAUM, M.J. Signaling pathways mediating insulin-stimulated glucose transport. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 892, p. 169-186, 1999.

SWALI, A.; WATHES, D.C. Influence of the dam and sire on size at birth and subsequent growth, milk production and fertility in dairy heifers. *Theriogenology*, v. 66, p. 1173-1184, 2006.

TAMADA, H.; HIGASHIYAMA, C.; TAKANO, H.; KAWATE, N.; INABA, T.; SAWADA, T. The effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on preimplantation embryo development and implantation in the rat. *Life Sciences*, v. 64, p. 1967-1973, 1999.

TAYLOR, V.J.; BEEVER, D.E.; WATHES, D.C. Physiological adaptations to milk production that affect fertility in high yielding dairy cows. *Dairying, using science to meet consumer needs. Brazilian Society of Animal Science*, v. 29, p. 37-71, 2003.

TAYLOR, V.J.; CHENG, Z.; PUSHPAKUMARA, P.G.A.; BEEVER, D.E.; WATHES, D.C. Fertility and yield in lactating dairy cows: relationship to plasma IGF-I in the peripartum period. *Veterinary Record*, v. 155, p. 583-588, 2004.

TELFORD, N.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Molecular Reproduction and Development*, v. 26, p. 90-100, 1990.

TERADA, Y.; FUKAYA, T.; TAKAHASHI, M.; YAJIMA, A. Expression of growth hormone receptor in mouse preimplantation embryos. *Molecular Human Reproduction*, v. 2, p. 879-881, 1996.

THATCHER, W.W.; MACMILLAN, K.L.; HANSEN, P.J. DROST, M. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology*, v. 31, p. 149-164, 1989.

THOMPSON, J.G. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*, v. 45, p. 27-40, 1996.

THOMPSON, J.G. The impact of nutrition of the cumulus oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants. *Journal of Reproduction and Development*, v. 52, p. 169-175, 2006.

THOMPSON, J.G.; PARTRIDGE, R.J.; HOUGHTON, F.D.; KENNEDY, C.J.; PULLAR, D.; LEESE, H.J. Oxygen consumption by Day 7 bovine blastocysts: Determination of ATP production. *Animal Reproduction Science*, v. 43, p. 241-247, 1996.

THOMPSON, J.G.; ALLEN, N.W.; TERVIT, H.R. Protein synthesis and uptake by bovine day 7 embryos produced under different incubation systems. *Theriogenology*, v. 49, p. 235-235, 1998.

THOMPSON, J.G.; MCNAUGHTON, C.; GASPARRINI, B.; MCGOWAN, L.T. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 118, p. 47-55, 2000.

TROUT, W.E.; MCDONELL, J.J.; KRAMER, K.K.; BAUMBACH, G.A.; ROBERTS, R.M. The retinol binding protein of the expanding pig blastocyst: molecular cloning and expression in trophectoderm and embryonic disc. *Molecular Endocrinology*, v. 5, p. 1533-1540, 1991.

VESTWEBER, D.; GOSSLER, A.; BOLLER, K.; KELMER, R. Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Developmental Biology*, v. 124, p. 451-456, 1987.

VONNHAME, K.A.; HESS, B.W.; NIJLAND, M.J.; NATHANIELSZ, P.W.; FORD, S.P. Placentomal differentiation may compensate for maternal nutrient restriction in ewes adapted to harsh range conditions. *Journal of Animal Science*, v. 84, p. 3451-3459, 2006.

WALES, R.G.; WAUGH, E.E. Catabolic utilisation of glucose by the sheep conceptus between days 13 and 19 of pregnancy. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 5, p. 111-122, 1993.

WALLACE, J.M.; AITKEN, R.P.; CHEYNE, M.A. Effect of postovulation nutritional status on early conceptus survival and growth in vivo and luteotrophic protein secretion in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 6, p. 253-259, 1994.

WALLACE, J.M.; DA SILVA, P.; AITKEN, R.P.; CRUICKSHANK, M.A. Maternal endocrine status in relation to pregnancy outcome in rapidly growing adolescent sheep. *Journal of Endocrinology* v. 155, p. 359-368, 1997.

WANG, Q.X.; LATHAM, K.E. Translation of maternal messenger ribonucleic acids encoding transcription factors during genome activation in early mouse embryos. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 969-978, 2000.

- WATERS, M.; KAYE, P. The role of growth hormone in fetal development. *Growth Hormone and IGF Research*, v. 12, p. 137-146, 2002.
- WATHES, D.C.; REYNOLDS, T.S.; ROBINSON, R.S.; STEVENSON, K.R. Role of insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 1778–1789, 1998.
- WATSON, A.J.; HOGAN, A.; HAHNEL, A., WIEMER, E.; SCHULTZ, G.A. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Molecular Reproduction and Development*, v. 31, p. 87–95, 1992.
- WATSON, A.J.; WATSON, P.H.; ARCELLANA-PANLILIO, M.; WARNES, D.; WALKER, S.K.; SCHULTZ, G.A.; ARMSTRONG, D.T.; SEAMARK, R.F. A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development. *Biology of Reproduction*, v. 50, p. 725-733, 1994.
- WATSON, A.J.; BARCROFT, L.C. Regulation of blastocyst formation. *Frontiers in Bioscience*, v. 6, p. 708-730, 2001.
- WATSON, A.J.; NATALE, D.R.; BARCROFT, L.C. Molecular regulation of blastocyst formation. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 583-592, 2004.
- WAUGH, E.E.; WALES, R.G. Incorporation of substrate carbon from [U-¹⁴C] acetate by sheep conceptus recovered from the uterus on days 13 to 19 of pregnancy. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 5, p. 209-217, 1993.
- WETTERAU, L.A.; MOORE, M.G.; LEE, K.W.; SHIM, M.L.; COHEN, P. Novel aspects of the insulin-like growth factor binding proteins. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 68, p. 161–181, 1999.
- WILLIAMS, A.H.; CUMMING, LA. Inverse relationship between concentration of progesterone and nutrition in ewes. *Journal of Agriculture Science*, v. 98, p. 517-522, 1982.
- WILMUT, I.; SALES, D.I. Effect of an asynchronous environment on embryonic development in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 61, p. 179-184, 1981.
- WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GUMEN, A. Changes in reproductive physiology lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, v. 65, p. 17-29, 2006.

WINTENBERGER-TORRES, S.; FLECHON, J.E. Ultrastructural evolution of the trophoblast cells of the pre-implantation sheep blastocyst from day 8 to day 18. *Journal of Anatomy*, v. 118, p. 143-153, 1974.

WORRAD, D.M.; SCHULTZ, R.M. Regulation of gene expression in the preimplantation mouse embryo: temporal and spatial patterns of expression of the transcription factor SP1. *Molecular Reproduction and Development*, v. 46, p. 268-277, 1997.

WUU, Y.D.; PAMPFER, S.; BECQUET, P.; VANDERHEYDEN, I.; LEE, K.H.; DE HERTOOGH, R. Tumor necrosis factor alpha decreases the viability of mouse blastocysts in vitro and in vivo. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 479-483, 1999.

YAAKUB, H.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M.P. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology*, v. 51, p. 1259-1266, 1999.

YASEEN, M.A.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W.; 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/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. *Reproduction*, v. 122, p. 601-610, 2001.

11 ANEXOS

FOTOS DO EXPERIMENTO

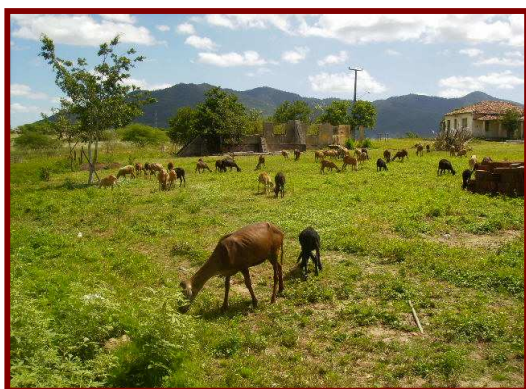


Figura 1. Fazenda experimental Campo da Semente e suas instalações.

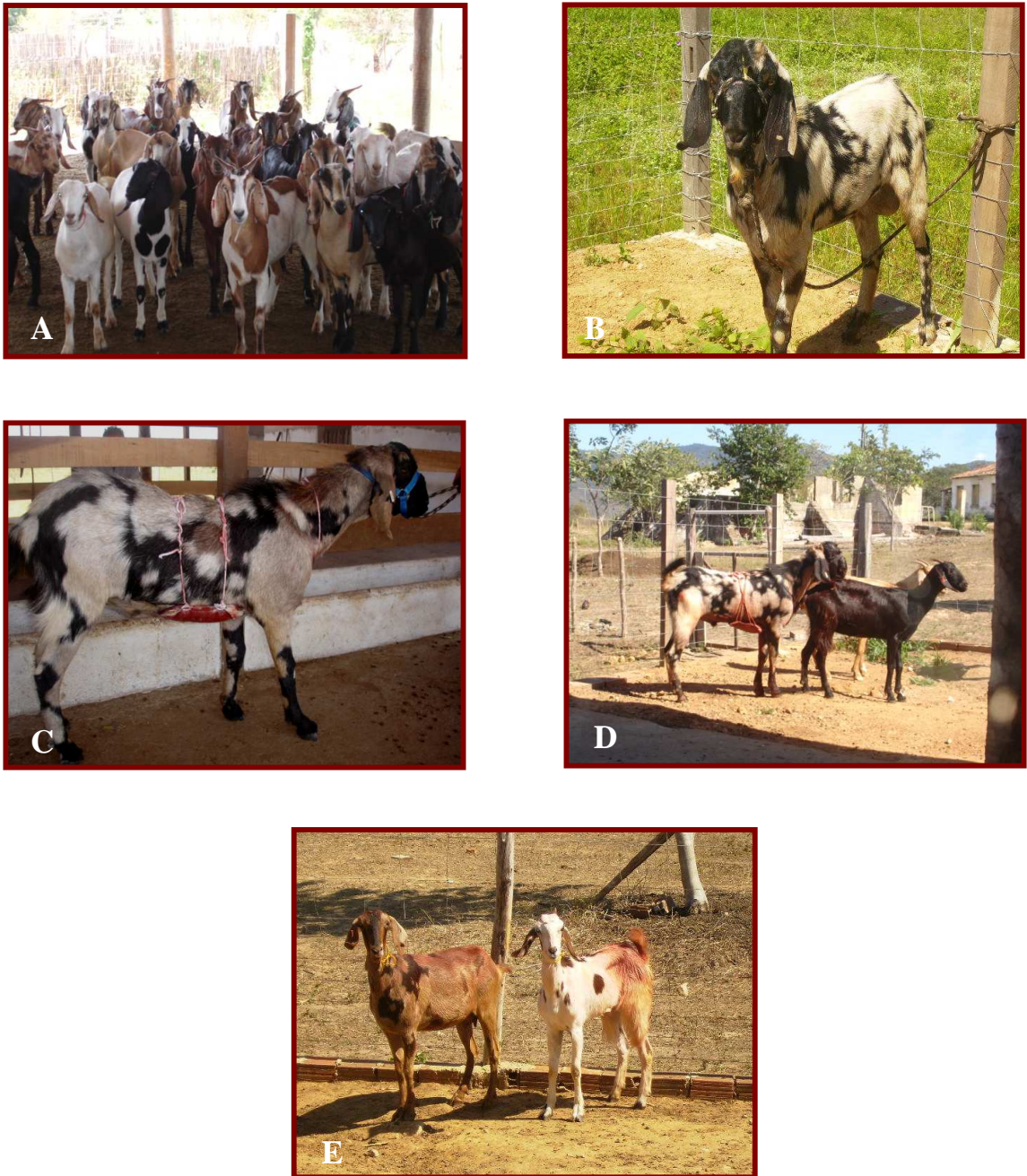


Figura 2. (A) Fêmeas experimentais; (B) Bode experimental; (C) Bode utilizando marcador impregnado com tinta; (D) Detecção de estro das fêmeas; (E) Fêmeas marcadas após a monta natural.



Figura 3. Procedimentos com as fêmeas experimentais. (A) Aplicação subcutânea de insulina; (B) Colheita de sangue para dosagens hormonais; (C) Diagnóstico de gestação por ultra-sonografia transretal.



Figura 4. Nascimento das crias ao término do experimento.