

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(CLÍNICA E REPRODUÇÃO ANIMAL)

GUSTAVO BERVIAN DOS SANTOS

EFEITO DE DIFERENTES DIETAS NA PUBERDADE E FERTILIDADE DE NOVILHAS
LEITEIRAS E NOS PARÂMETROS PRODUTIVOS E REPRODUTIVOS NO PÓS-
PARTO DE PRIMÍPARAS DE DIFERENTES GRAUS DE SANGUE HOLANDÊS X GIR

Niterói, RJ

2018

GUSTAVO BERVIAN DOS SANTOS

EFEITO DE DIFERENTES DIETAS NA PUBERDADE E FERTILIDADE DE NOVILHAS
LEITEIRAS E NOS PARÂMETROS PRODUTIVOS E REPRODUTIVOS NO PÓS-
PARTO DE PRIMÍPARAS DE DIFERENTES GRAUS DE SANGUE HOLANDÊS X GIR

Tese aprovada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária da
Universidade Federal Fluminense, como
requisito parcial para obtenção do Grau de
Doutor em Medicina Veterinária. Área de
Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientador:

PROF. DR. FELIPE ZANDONADI BRANDÃO

Coorientador:

DR. BRUNO CAMPOS DE CARVALHO

Niterói, RJ

2018

Ficha catalográfica automática - SDC/BFV

D722e Dos Santos, Gustavo Bervian
EFEITO DE DIFERENTES DIETAS NA PUBERDADE E FERTILIDADE DE
NOVILHAS LEITEIRAS E NOS PARÂMETROS PRODUTIVOS E REPRODUTIVOS
NO PÓS-PARTO DE PRIMÍPARAS DE DIFERENTES GRAUS DE SANGUE
HOLANDÊS X GIR / Gustavo Bervian Dos Santos ; Felipe
Zandonadi Brandão, orientador ; Bruno Campos de Carvalho,
coorientador. Niterói, 2018.
148 f.

Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói,
2018.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/MPV-CV.2018.d.01433314002>

1. Bovinos de leite. 2. Puberdade. 3. Pós-parto. 4.
Reprodução animal. 5. Produção intelectual. I. Título II.
Zandonadi Brandão, Felipe , orientador. III. Campos de
Carvalho, Bruno, coorientador. IV. Universidade Federal
Fluminense. Faculdade de Veterinária.

CDD -

Bibliotecária responsável: Ana Claudia Ferreira Messias - CRB7/5786

GUSTAVO BERVIAN DOS SANTOS

EFEITO DE DIFERENTES DIETAS NA PUBERDADE E FERTILIDADE DE NOVILHAS
LEITEIRAS E NOS PARÂMETROS PRODUTIVOS E REPRODUTIVOS NO PÓS-
PARTO DE PRIMÍPARAS DE DIFERENTES GRAUS DE SANGUE HOLANDÊS X GIR

Tese aprovada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária da
Universidade Federal Fluminense, como
requisito parcial para obtenção do Grau de
Doutor em Medicina Veterinária. Área de
Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Aprovado em 27 de julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão - UFF

Prof. Dra. Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan -UFF

Dr. Eduardo Kenji Nunes Arashiro - UFF

Prof. Dr. Marcos Bourg – UFRRJ

Dr. Luiz Gustavo Bruno Siqueira – Embrapa Gado de Leite

Niterói, RJ

2018

AGRADECIMENTOS

A meus pais os quais me ensinaram a ser um homem honesto, de princípios e valor; que sempre apoiaram minhas decisões e nunca mediram esforços para que meus sonhos tornassem realidade.

À Universidade Federal Fluminense pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

Ao meu orientador Prof^o Felipe Zandonadi Brandão pela oportunidade, confiança, apoio e aprendizado passados desde o mestrado.

Ao meu coorientador Pesquisador Dr^o Bruno Campo de Carvalho pelos ensinamentos, confiança, oportunidade, pelos momentos bons e ruins vividos durante essa etapa.

À EMBRAPA Gado de Leite pela oportunidade de realizar todo o experimento.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPEMIG pela concessão do auxílio financeiro para a realização da pesquisa (CVZ-APQ 02399-10).

Aos funcionários, estagiários, pós-graduandos e pós-doutorandos da Embrapa Gado de Leite e da Universidade Federal Fluminense que de alguma forma contribuíram.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pelo convívio e aprendizado.

Aos “meus pais” “embrapeanos” Geraldinho e Aparecida e sua família pela amizade, carinho, acolhimento como “filho”, meu muito obrigado por todos os momentos felizes que passamos juntos.

Aos amigos de Coronel Pacheco por todo esse tempo de amizade.

A todas aquelas pessoas aqui não citadas, mas que, de alguma forma contribuíram pelo meu crescimento pessoal e profissional, não só neste período, mas em toda minha vida.

RESUMO

Objetivou-se estudar a fisiologia reprodutiva à puberdade, bem como, os parâmetros produtivos, reprodutivos e metabólicos de vacas primíparas mestiças leiteiras no pós-parto. O experimento 1 avaliou os parâmetros reprodutivos de novilhas submetidas a quatro diferentes dietas na fase pré-desmama. Bezerras do cruzamento Holandês x Gir (n=60) foram distribuídas em quatro tratamentos experimentais considerando o nível de matéria seca (T1 = 13,5%, T2 = 16,1%, T3 = 18,2% e T4 = 20,4%) na fase de aleitamento. A puberdade foi determinada através de análise semanal das concentrações circulantes de progesterona. Quando as novilhas atingiram 250 kg de peso vivo, foram iniciadas avaliações quinzenais do trato reprodutivo, realizadas por palpação transretal e ultrassonografia. Os seguintes parâmetros foram avaliados: tônus uterino, diâmetro dos cornos uterinos, tamanho dos ovários, diâmetro do maior folículo ovariano, ocorrências de ciclos estrais curtos e taxa de concepção. A idade média a puberdade não diferiu entre os tratamentos ($305,7 \pm 4,73$ dias), assim como o peso à puberdade ($285,8 \pm 3,41$ kg). Todas as novilhas deste estudo foram púberes antes de atingir 350 kg de peso vivo. Não se observou efeito ($P > 0,05$) da dieta de aleitamento sobre as variáveis escore do tônus uterino ($4,4 \pm 0,38$), diâmetro dos cornos uterinos ($13,43 \pm 0,66$ mm) e diâmetro do ovário ($20,16 \pm 1,37$ mm). A dieta não influenciou o diâmetro dos cornos uterinos, diâmetro do ovário, tônus uterino, mas influenciou na ocorrência de ciclos curtos. Entretanto, o aumento do total de sólidos no leite integral pela adição de sucedâneo de leite a 20,4% de matéria seca durante o período pré-desmame foi responsável pela maior fertilidade após a primeira inseminação artificial. O experimento 2 avaliou o período pós-parto de vacas primíparas 3/4 e 7/8 Holandês x Gir (HG) alimentadas com duas dietas: com alto e baixo nível de energia. Todas as vacas apresentaram balanço energético negativo (BEN) durante as primeiras oito semanas pós-parto, sendo que na segunda semana foi observado o BEN mais intenso ($-6,47 \pm 3,86$ Mcal / kg). Aos 61 dias pós-parto, as vacas 3/4 HG apresentaram maior peso e escore de condição corporal (ECC) que as 7/8 HG ($456,4 \pm 8,2$ e $429,3 \pm 8,5$ kg; $3,13 \pm 0,03$ e $2,94 \pm 0,03$). O leite das vacas alimentadas com a dieta de alta energia apresentou maiores porcentagens de gordura, proteína, lactose e extrato seco total do que as vacas alimentadas com a dieta de baixa energia.

As vacas alimentadas com a dieta de alta energia apresentaram maior consumo de energia líquida ($95,3 \pm 1,9$ vs. $88,1 \pm 2,1$ MJ / dia) e maior balanço energético ($3,64 \pm 2,13$ vs. $-6,02 \pm 2,30$ MJ / dia), independente do grupo genético. As vacas 3/4 HG apresentaram maior energia para manutenção ($33,1 \pm 0,4$ MJ / dia) do que as 7/8 HG ($31,5 \pm 0,5$ MJ / dia). Assim, as primíparas 3/4 HG foram mais eficientes e apresentaram maior ECC no decorrer do período pós-parto. A dieta com alta energia propiciou maior balanço energético, com maior produção de gordura, proteína e lactose no leite. O experimento 3 avaliou o efeito da dieta oferecida sobre o metabolismo, concentrações hormonais e a produção de oócitos e embriões de primíparas HG no pós-parto. Foram avaliadas as concentrações de estradiol, progesterona, glicose, insulina, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), uréia e ácidos graxos não esterificados no fluido folicular, bem como as concentrações plasmáticas de glicose, insulina, uréia e ácidos graxos não esterificados. A dieta com alta energia aumentou as concentrações plasmáticas de insulina e glicose. As vacas 3/4 HG apresentaram maior concentração plasmática de insulina, glicose e uréia. As alterações hormonais e metabólicas no plasma não foram observadas no fluido folicular. A concentração de IGF-I no fluido folicular foi maior em vacas alimentadas com a dieta de alta energia e nas vacas 3/4 HG. Foi recuperado um número maior de oócitos totais e viáveis em vacas 3/4 HG, mas as vacas 7/8 HG obtiveram maior taxa de clivagem. A dieta de alta energia foi mais eficiente na manutenção do estado energético das vacas evidenciadas pelos metabólitos no plasma e no fluido folicular. Vacas 3/4 HG foram mais eficientes que vacas de 7/8 HG na produção de oócitos no período pós-parto.

Palavras-chave: nutrição, pós-parto, balanço energético, reprodução, bovino

Abstract

The aim of this study was to evaluate the reproductive physiology in the puberty as well as evaluate productive, reproductive and metabolic parameters of primiparous crossbred dairy cows in the pos partum period. To achieve these objectives, we conducted 2 experiments. The first trial evaluated reproductive parameters of heifers fed with four different diets in the pre-weaning stage. Crossbred Holstein x Gyr cows (n = 60) were distributed in four experimental treatments consisting of increasing levels of dry matter in their liquid diet (T1 = 13.5%, T2 = 16.1%, T3 = 18.2% and T4 = 20.4%). Puberty was determined by weekly analysis of plasmatic concentrations of progesterone. The average age at puberty was did not differ between treatments (305.7 ± 4.73 days), and so was the weight at puberty (285.8 ± 3.41 Kg). All heifers of this study were pubertal before reaching 350 Kg body weight. When heifers reached 250 kg BW were started reproductive tract evaluations, performed via transrectal palpation and ultrasonography biweekly. The following parameters were evaluated: uterine tonus, uterine horn thickness, ovarian size, diameter of the largest ovarian follicle, occurrences of short estrous cycles, and conception rate. The average age at puberty was did not differ between treatments (305.7 ± 4.73 days), and so was the weight at puberty (285.8 ± 3.41 Kg). All heifers of this study were pubescent before reaching 350 Kg body weight. Also, there was no effect ($P>0.05$) of the diet offered in the variables: uterine tonus (4.4 ± 0.38), uterine horn thickness (13.43 ± 0.66 mm) and ovary size (20.16 ± 1.37 mm). However, the increase of total solids in whole milk by the addition of milk replacer to 20.4% of dry matter during the pre-weaning period was responsible for fertility after the first artificial insemination. Experiment 2 evaluated postpartum period of primiparous 3/4 and 7/8 Holstein x Gyr (HG) cows fed two diets: high and low energy. All cows presented negative energy balance (NEB) during the first eight weeks postpartum and in the second week the most intense NEB was observed (-6.47 ± 3.86 Mcal/kg). At 61 days postpartum, 3/4 HG cows presented higher body weight and body condition score (ECC) than 7/8 HG (456.4 ± 8.2 vs. 429.3 ± 8.5 kg and 3.13 ± 0.03 vs. 2.94 ± 0.03). The milk of cows fed the high energy diet had higher percentages of fat, protein, lactose and total dry extract than cows fed the low energy diet. Cows fed the high energy diet had higher net energy consumption (95.3 ± 1.9 vs. 88.1 ± 2.1 MJ / day) and higher energy balance (3.64 ± 2.13 vs. -6.02 ± 2.30 MJ / day), independent of

the genetic group. Cows 3/4 HG presented higher energy for maintenance (33.1 ± 0.4 MJ / day) than 7/8 HG (31.5 ± 0.5 MJ / day). Thus, the 3/4 HG primiparous were more efficient and presented higher ECC during the postpartum period. The high energy diet provided a greater energy balance, with higher production of fat, protein and lactose in milk. Experiment 3 evaluated the effect of the diet offered on the metabolism, hormonal concentrations and the production of oocytes and embryos of HG primiparous in postpartum. The concentrations of estradiol, progesterone, glucose, insulin, insulin-like growth factor, urea and non-esterified fatty acids in follicular fluid, as well as plasma concentrations of glucose, insulin, urea and non-esterified fatty acids were evaluated. The high energy diet increased plasmatic insulin and glucose concentrations. Cows 3/4 HG showed higher plasmatic concentration of insulin, glucose and urea. The hormonal and metabolic changes in plasma were not observed in the follicular fluid. IGF-I concentration in follicular fluid was higher in cows fed the high energy diet and in 3/4 HG cows. A higher number of viable oocytes were recovered in 3/4 HG cows, but the 7/8 HG cows had a higher rate of cleavage. The high energy diet was more efficient in maintaining the energy status of cows evidenced by metabolites in plasma and follicular fluid. Cows 3/4 HG were more efficient than cows of 7/8 HG in oocyte production in the postpartum period.

Keywords: nutrition, postpartum, energy balance, reproduction, bovine

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1. Diagrama esquemático do protocolo de sincronização de estro e inseminação artificial a tempo fixo (IATF)	102
Figura 2. Escore do tônus uterino de novilhas mestiças Holandês x Gir (até 3/8 Gyr) entre 4 semanas antes e 7 semanas após a puberdade.....	103
Figura 3. Diâmetro do corno uterino médio de novilhas mestiças Holandês x Gir (até 3/8 Gyr) entre as 4 semanas antes e 7 semanas após a puberdade.....	103
Figura 4. Diâmetro ovariano de novilhas mestiças Holandês x Gir (até 3/8 Gyr) entre 4 semanas antes e 7 semanas após a puberdade.....	104
Figura 5. Diâmetro do maior folículo ovariano de novilhas mestiças Holandês x Gir (até 3/8 Gyr) aleitadas com quatro diferentes teores de matéria seca no leite integral e avaliadas entre 4 semanas antes e 7 semanas após a puberdade.....	104
Figura 6. Porcentagem de ciclos curtos apresentado pelas novilhas mestiças Holandês x Gir (até 3/8 Gyr) aleitadas com quatro diferentes teores de matéria seca no leite integral e avaliadas entre 4 semanas antes e 7 semanas após a puberdade.....	105
Figura 7. Porcentagem de concepção apresentado na primeira inseminação das novilhas mestiças Holandês x Gir (até 3/8 Gyr) aleitadas com 4 diferentes teores de matéria seca no leite integral e avaliadas entre 4 semanas antes e 7 semanas após a puberdade.....	105
Figura 8. Porcentagem de concepção (acumulado) na primeira e segunda inseminação das novilhas mestiças Holandês x Gir (até 3/8 Gyr) aleitadas com 4 diferentes teores de matéria seca no leite integral e avaliadas entre 4 semanas antes e 7 semanas após a puberdade.....	106

Capítulo 3

Figure 1- Milk yield (MY) and fat corrected milk (FCM) of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period....	119
Figure 2- Percentage of protein in milk of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.....	119
Figure 3- Fat:protein ratio (F:P) in milk of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.....	120
Figure 4- Dry matter intake (DMI) and net energy intake (NEI) of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.....	120
Figure 5- Net energy of lactation (NE _{lac}) of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.....	121
Figure 6- Dry matter intake (DMI) of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.....	121
Figure 7- Net energy intake (NEI) of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.....	123

Figure 8- Energy balance of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.....122

Capítulo 4

Figure 1. Concentrations of estradiol (E2FF) (ng/ml) and IGF-I (IGF-IFF) (ng/ml) in dominant follicular fluid and plasmatic glucose (GlucP) (mg/dl) mg/d during the early postpartum period of primiparous crossbred 3/4 and 7/8 HG dairy cows fed low and high energy diets.....142

Figure 2. Concentration of non-esterified fatty acid in follicular fluid and in plasma from crossbred primiparous cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.....142

Figure 3. Number of total follicles per cow and diameter of dominant follicle (DF) from crossbred primiparous cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.....143

Figure 4. Cleavage and blastocyst rate from crossbred primiparous cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.....143

Capítulo 2

Tabela 1: Número de observações obtidas durante os exames ginecológicos em novilhas em diferentes períodos relativos a detecção da puberdade. A semana 0 foi determinada como sendo a semana em que se detectou concentração a primeira concentração plasmática de progesterona $\geq 1\text{ng/ml}$, que foi necessariamente seguida por outra detecção de progesterona $\geq 1\text{ng/ml}$ na semana subsequente.....102

Capítulo 3

Tabela 1. Composition of total diet provided to primiparous crossbred dairy cows during the early postpartum period.....123

Tabela 2. Effect of diet, genetic group, postpartum week on and their interactions with the weight, body condition, yield and milk composition of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.....124

Tabela 3. Effect of diet, genetic group, postpartum week on and their interactions with food consumption and energy balance of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.....125

Capítulo 4

Table 1. Composition of total diet provided to primiparous crossbred dairy cows during the early postpartum period.....144

Table 2. Effect of diet, genetic group, days postpartum and their interactions on metabolic and hormonal parameters in primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.....145

Table 3. Number of total and viable oocytes recovered from crossbred primiparous cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diet during the early postpartum period.....146

Table 4. Cleavage and blastocyst rate during the first 56 days postpartum in crossbred (3/4 and 7/8 HG) cows fed high and low energy diets.....146

AGNE	Ácidos Graxos Não Esterificados
BEN	Balanço Energético Negativo
BHB	Beta hidroxibutirato
BSA	Albumina Sérica Bovina
Ca	Cálcio
CEJHB	Campo Experimental José Henrique Brushi
CFDN	Consumo De Fibra em Detergente Neutro
CFDNPV	Consumo De Fibra em Detergente Neutro Relação ao Peso Vivo
CL	Corpo Lúteo
Cm	Centímetros
CMS	Consumo de Matéria Seca
CMSPV	Consumo de Matéria Seca em Relação ao Peso Vivo
CNF	Carboidratos Não Fibroso
CO ₂	Gás Carbônico
COCs	Complexo Cúmulus Oócito
dL	Decilitro
DP	Desvio Padrão
E2	Estrógeno
EB	Energia Bruta
ECC	Escore de Condição Corporal
EE	Extrato Etéreo
EL	Energia de Lactação
EL	Energia Líquida
EM	Energia Metabolizável
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EST	Extrato Seco Desengordurado
ETR	Escore do Trato Reprodutivo
FD	Folículo Dominante
FDA	Fibra Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro

FIV	Fecundação <i>in Vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
g	Grama
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
G4	Grupo 4
GH	Hormônio de Crescimento
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
h	Horas
HG	Holandês x Gir
HZ	Holandês x Zebu
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
IGF-I	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina-1
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
K	Potássio
Kg	Quilograma
KHz	Quilohertz
LAA	Laboratório de Análise de Alimentos
LCE	Leite Corrigido para Energia
LH	Hormônio Luteinizante
LIPE	Lignina Purificada Enriquecida
LQL	Laboratório de Qualidade do Leite
Mcal	Megacalorias
mEq/L	Miliequivalentes por litro
Mg	Magnésio
mg	Miligramas
mHz	Megahertz

MIV	Maturação <i>in Vitro</i>
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mm ²	Milímetros quadrados
mmHg	Milímetros de Mercúrio
mmol/ L	Milimol por Litro
µg/mL	Micrograma por Mililitro
µL	Microlitro
MN	Matéria Natural
MS	Matéria Seca
NDT	Nutrientes Digestíveis Totais
ng/ml	Nanograma por Mililitros
OPU	Ovum Pick Up
OD	Ovário direito
OE	Ovário Esquerdo
P	Fósforo
P4	Progesterona
PB	Proteína Bruta
PBS	Solução Salina Fosfatada Tamponada
PGF2 α	Prostaglandina
pH	Potencial de Hidrogenio
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de Embriões
PLC	Produção de Leite Corrigida
PLCG	Produção de Leite Corrigida para 4% de gordura
RGP	Relação Gordura Proteina
RIA	Radioimunoensaio em Fase Sólida
SFB	Soro Fetal Bovino
TE	Transferência de Embrião
UI	Unidade Internacional
US	Ultrassom
vs	Versus

V/C	Relação Volumoso Concentrado
X ²	Qui-quadrado
Zn	Zinco
°C	Graus Celsius
%	Porcento ou porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 CAPÍTULO 1	20
2.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1.1 IMPORTÂNCIA DA IDADE AO PRIMEIRO PARTO	20
2.1.2 ENDOCRINOLOGIA NA PUBERDADE E MATURAÇÃO SEXUAL DE NOVILHAS	21
2.1.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A PUBERDADE DE NOVILHAS LEITEIRAS	23
2.1.3.1 Genótipo (<i>Bos taurus</i> vs <i>Bos indicus</i>)	23
2.1.3.2 Nutrição, Idade e Ganho de Peso	24
2.1.4 Utilização do Escore do Trato Reprodutivo (ETR) como fator de avaliação da puberdade	29
2.1.5 FOLICULOGÊNESE	31
2.1.6 PUERPÉRIO E RETORNO DA ATIVIDADE OVARIANA	32
2.1.7 CICLOS CURTOS	35
2.1.8 QUALIDADE DO OÓCITO	36
2.1.9 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	37
2.1.10 PERÍODO DE TRANSIÇÃO	40
2.1.11 CONSUMO DE MATÉRIA SECA	42
2.1.12 ESCORE DA CONDIÇÃO CORPORAL	43
2.1.13 BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO (BEN)	46
2.1.14 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE LEITE	48
2.1.15 PERFIL METABÓLICO E HORMONAL NO PÓS-PARTO	52
2.1.15.1 Ácidos Graxos não Esterificados (AGNE)	52
2.1.15.2 Glicose	54
2.1.15.3 Insulina	55
2.1.15.4 IGF- I	57
2.1.15.5 Ureia	59
2.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
3 OBJETIVO GERAL	87
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	88
4 HIPÓTESES	88
5 CAPÍTULO 2	89
Efeito de dietas pré-desmama sobre o desenvolvimento do trato reprodutivo e taxa de concepção de novilhas	90

6 CAPÍTULO 3	105
Milk production and composition, food consumption and energy balance of postpartum crossbred holstein-gir dairy cows fed two diets of different energy levels	105
7 CAPÍTULO 4	124
Metabolic, follicular and embryo production responses of postpartum crossbred holstein × gir dairy cows fed diets with different energy levels	124
8 Anexos	144

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de leite tem grande importância tanto social quanto econômica para o Brasil (VILELA, 2001) e está presente em todos os estados brasileiros (IBGE, 2012). Apesar de haver um crescimento na produção de leite nos últimos anos e o Brasil ser o quinto maior produtor mundial de leite, sua produtividade que, é de aproximadamente de 1.400 litros/vaca/ano (IBGE, 2012), é considerada baixa comparada a países desenvolvidos como Estados Unidos e Canadá.

Cerca de 70% do rebanho brasileiro é constituído por animais mestiços (FREITAS e MIRANDA, 2009), produto do cruzamento entre raças zebuínas responsáveis pela rusticidade e raças europeias, especializadas em produção de leite. Dentre este cruzamento, encontramos diversos graus de sangue, desde 1/2 a 7/8 Holandês x Gir. Portanto, este cruzamento é de extrema importância para a cadeia produtiva de leite, pela sua adaptabilidade e alta produção em condições brasileiras.

A cria e recria de bezerras e novilhas dentro de muitas propriedades leiteiras são normalmente negligenciadas pelo produtor, por ser as fases que o retorno do investimento não é imediato, quando comparado com vacas no período de lactação.

A criação de bezerras e novilhas de reposição tem como objetivo alcançar um crescimento adequado, de forma que essas fêmeas possam atingir uma idade ao primeiro parto ideal, com baixo custo, e que possam substituir vacas de descarte do rebanho em lactação. É na fase de aleitamento das bezerras que estratégias nutricionais devem ser adotadas visando atingir ganhos de peso satisfatórios até sua puberdade, fazendo com que se obtenha a redução na idade ao primeiro parto. Outro desafio de grande importância das propriedades leiteiras é o manejo de novilhas pós-parto. Esta categoria animal ainda necessita ganhar peso corporal já que é esperada a ocorrência do primeiro parto com 82% do peso adulto (NRC, 2001). Período esse desafiado pela produção de leite, balanço energético negativo (BEN) e de terminar seu crescimento até atingir seu peso adulto.

O atraso no retorno da atividade ovariana luteal cíclica após o parto pode estar associado ao BEN, já que esse é consequência do baixo consumo de

matéria seca (CMS) e a alta produção de leite. A vaca sai do período seco e inicia a lactação com um aumento repentino na demanda de energia para a produção de leite (BAUMAN e CURRIE,1980). Nesta fase, uma baixa ingestão de matéria seca não compensa a alta demanda de energia destinada para a produção de leite. Conseqüentemente, vacas nesse período apresenta um BEN, sendo mais acentuado ou não dependendo do indivíduo, raça ou cruzamento. Vacas mestiças apresentam um BEN menos intenso, pois sua produção de leite não é considerada alta comparada àquelas vacas especializadas (raça Holandês) cuja produção é alta.

Ainda existem várias lacunas a serem preenchidas quanto à nutrição e puberdade de novilhas e também é necessário avançar nos conhecimentos dos efeitos do pós-parto sobre a reprodução de fêmeas mestiças leiteiras criadas em condições tropicais brasileira. Sendo assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar a puberdade de novilhas mestiças leiteira alimentas com quatro diferentes dietas na fase de aleitamento e avaliar o balanço energético, perfil metabólico e hormonal, parâmetros reprodutivos e produção e composição de leite de vacas mestiças leiteiras primíparas de dois grupos genéticos (3/4 e 7/8 Holandês x Gir) suplementadas ou não com dieta energética nos primeiros 60 dias de pós-parto.

2 CAPÍTULO 1

2.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1.1 IMPORTÂNCIA DA IDADE AO PRIMEIRO PARTO

Muitos sistemas de produção de leite não dão a adequada atenção para os animais que serão as futuras matrizes do seu rebanho. Na grande maioria das propriedades do Brasil, o manejo no período pós aleitamento é negligenciado. Bezerras são conduzidas para pastos mais pobres com aporte insuficiente de nutrientes (NOGUEIRA et al., 2015). visto que esses animais têm menor impacto sobre a receita da propriedade, quando comparadas com as vacas em lactação.

Para obter sucesso nessa fase, é preciso ter um adequado sistema de criação, com alimentação e manejo apropriados, associado à redução do custo de produção.

Para uma boa rentabilidade do rebanho é importante o encurtamento da idade a puberdade de novilhas. Com a gestação precoce das novilhas, estas poderão ser mais produtivas ao longo da vida produtiva, aumentando assim os índices econômicos (SANTOS e DAMASCENO, 1999).

A obtenção de índices zootécnicos adequados na criação de bovinos de leite influencia na composição e evolução dos rebanhos, sendo a idade ao primeiro parto a segunda maior responsável pela evolução dos rebanhos, ficando atrás da natalidade e seguida da taxa de descarte e de mortalidade (LOPES et al., 2009).

Lopes et al. (2009) constata que quando a idade ao primeiro parto é reduzida de 36 para 24 meses, o número médio de animais na categoria “vacas em lactação” é cerca de 10% maior e a estabilização do rebanho ocorre aos 23 anos ao invés dos 30 anos anteriores. Tal fato é de grande relevância, pois os rebanhos terão maior quantidade de animais na fase produtiva, o que leva à maior escala de produção de leite e conseqüente redução dos custos fixos (LOPES et al., 2004).

2.1.2 ENDOCRINOLOGIA NA PUBERDADE E MATURAÇÃO SEXUAL DE NOVILHAS

Puberdade é o termo utilizado para definir o início da vida reprodutiva da fêmea, com início da atividade ovariana, marcado por um processo gradual de maturação, iniciado ainda na vida fetal (DAY et al., 1984; 1987), que culmina com a capacidade de reproduzir (KINDER et al., 1987).

Quando a novilha por sua vez alcança a sua máxima capacidade reprodutiva (maturidade sexual), o que normalmente acontece após dois a três ciclos estrais com fases luteais normais, há o aumento da fertilidade (MORAN et al., 1989; BAGLEY, 1993; BURNS et al., 2010) e assim a mesma tem a capacidade em conceber e manter a gestação a termo (KINDER et al., 1987). Sendo assim, a maturidade sexual das fêmeas bovinas se dá por volta de 40 a 60 dias após a puberdade (SANTOS e SÁ FILHO, 2006).

Uma série de eventos é relacionada para a ocorrência nas alterações fisiológicas e anatômicas responsáveis por desencadear a puberdade em novilhas. Esses eventos são regulados por mecanismos que controlam a liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (DAY et al., 1987).

Segundo Nogueira (2006), o hipotálamo age como uma interface entre o sistema nervoso central e o sistema endócrino. O hipotálamo secreta GnRH, esse após ser metabolizado pelas células da hipófise é responsável por controlar a liberação de outros hormônios (gonadotrófico-estimulante -FSH e luteinizante -LH), provocando o aumento da produção de esteróides sexuais pelos ovários (FOSTER e NAGATANI, 1999).

Alguns mecanismos endócrinos garantem que, após o nascimento, a bezerra não ative o sistema reprodutivo (SEMMELMANN et al., 2001). Nos bovinos, há uma exacerbação da retroalimentação negativa do estradiol (E_2) sobre o hipotálamo. Assim, a inibição da atividade reprodutiva acontece por uma sensibilidade excessiva do hipotálamo ao estradiol (DAY et al., 1987). A maior parte dos componentes do sistema endócrino que são requeridos para estimular a puberdade é funcional antes da puberdade ocorrer, mas este início é bloqueado por um feedback negativo do E_2 sobre a secreção de LH (KINDER, 1987; SCHILLO et al., 1992). A baixa quantidade de E_2 secretada pelos folículos ovarianos após o nascimento é suficiente para a supressão da secreção pulsátil

de LH (CARDOSO e NOGUEIRA, 2007), provocando falhas na ovulação desses folículos que entram em atresia (HAFEZ, 2004).

O LH e FSH agem no ovário, estimulando a produção de progesterona (P4), 17 β estradiol e indiretamente a inibina, que por sua vez, age no hipotálamo e hipófise, retroalimentando este eixo de forma positiva ou negativa dependendo o estado fisiológico da fêmea (EVANS et al., 1995, SHUPNIK, 1996). Melvin et al. (1999) também relataram aumento nas concentrações de FSH e E₂ durante as sucessivas ondas foliculares que antecederam a puberdade. Além disso, a frequência de pulsos de LH aumenta substancialmente com o surgimento da puberdade (DAY et al., 1987). Isto é conseguido através do *feedback* negativo diminuído sobre a secreção de estradiol de LH que ocorre durante este mesmo período peripuberal (GASSER, 2013).

Dias antes do desencadeamento da puberdade é evidenciado picos súbitos de P4 mesmo que não ocorra a ovulação, acreditando ter duas origens; produzida pela glândula adrenal responsável pelos níveis basais de P4 e outra pode ser produzida pelos folículos luteinizados (FEDER et al., 1971; GONZALEZ-PADILLA et al., 1975).

Segundo Evans et al. (1994), durante a fase luteal ocorre uma liberação de P4 em concentração suficiente para sincronizar o desenvolvimento dos folículos e promover a sensibilização dos ovários sob ação do LH garantindo que ocorra um segundo pico pré-ovulatório do LH, o qual resultará na ovulação.

Sendo assim, não se define puberdade de uma novilha somente com a ocorrência do primeiro corpo lúteo ou até mesmo do acontecimento do primeiro estro, denominado estro não puberal. Este comportamento de estro acontece sem ovulação subsequente, quando as concentrações de E₂ foram suficientes para expressar o estro, mas não a ovulação (KINDER et al., 1995).

Em novilhas, a concentração plasmática de E₂ permanece baixa até um mês antes da puberdade, quando aumenta gradualmente até o momento da primeira ovulação (NAKADA et al., 2000). A ovulação é desencadeada por uma onda de LH, que é induzido pelo aumento do GnRH liberado pela hipófise (FOSTER e JACKSON, 2006).

Assim, o início da ciclicidade ovário é dependente de eventos que ocorrem no sistema nervoso central e que, em última instância, resulta em aumento da

libertação dos pulsos de GnRH dentro da circulação hipotalâmica-porta-hipofisária (RODRIGUEZ e WISE, 1989).

Desjardins e Hafs, (1969) estudando o desenvolvimento do trato reprodutivo pós-mortem observaram aumento lento forma linear no peso do útero do nascimento até a primeira ovulação. Ainda no mesmo estudo houve um aumento lento no início do desenvolvimento no peso de vagina e da cérvix com um crescimento pouco mais rápido a partir dos 4 meses até a primeira ovulação. Em trabalho mais recente Honaramooz et al., (2004) observaram os padrões de crescimento do trato reprodutivo, sendo um nos primeiros 3-4 meses de idade com crescimento lento e uma segunda fase decrescimento acelerado previamente a primeira ovulação.

Cerca de 30 a 60 dias antes da primeira ovulação há uma elevação na frequência dos pulsos de LH, período que há também aumento do tamanho dos folículos e o folículo dominante alcança seu diâmetro máximo (BERGFELD et al., 1994; HONARAMOOZ et al., 2004), acompanhado do aumento do útero, cérvix e vagina (HONARAMOOZ et al., 2004). Marcadamente o crescimento dos órgãos reprodutivos ocorre sob a influência de esteróides ovarianos, em novilhas pré-puberes (DAY et al., 1987)

2.1.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A PUBERDADE DE NOVILHAS LEITEIRAS

2.1.3.1 Genótipo (*Bos taurus* vs *Bos indicus*)

A puberdade em novilhas *Bos indicus* é mais tardia quando comparado a novilhas *Bos taurus* (RODRIGUES et al., 2002; SILVA et al., 2005). Foldager et al. (1988) ao estudarem novilhas taurinas das raças Holandesa e Dinamarquesa vermelhas observaram que estas podem atingir a puberdade precocemente (5-6 meses) ou tardiamente (18-20 meses de idade).

Em condições de manejo nutricional adequados, novilhas *Bos taurus* alcançam a puberdade mais precoce, em torno de 9 a 11 meses de idade e peso vivo entre 170 e 280 kg (SEJRSEN e PURUP, 1997), enquanto as *Bos indicus*

atingem a puberdade dos 18 aos 24 meses de idade, com peso vivo entre 260 e 350 kg (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Das principais raças leiteiras criadas no Brasil (Holandês, Gir e seus cruzamentos), Borges et al. (2015) demonstram diferenças da idade à puberdade sendo elas 9-11; 24-36 e 15-24 meses respectivamente. Souza et al. (1995) ao estudar em novilhas zebuínas descrevem a puberdade entre 22 e 36 meses e a idade ao primeiro parto entre 44 e 48 meses de idade. Teodoro et al. (2001) observaram que novilhas mestiças Holandês x Gir entraram em puberdade aos 756 dias de idade com 302 kg de peso vivo. Ainda relataram que estes animais pariram pela primeira vez com 400 kg aos 1121 dias de idade.

Em relação a novilhas F1 (Holandês x Zebu), são mais precoces que as zebuínas e atingem a idade à puberdade aos 18 meses com peso vivo entre 300 e 340 kg (RUAS et al., 2004, 2014), concordando com estudos de Galina e Arthur (1989), que demonstram que novilhas F1 HZ apresentaram redução de 22 para 15 meses na idade à primeira ovulação, em comparação às zebuínas. Analisando 6.781 registros de animais mestiços (HG) Freitas et al. (2002), observaram redução da idade ao primeiro parto em novilhas 7/8 HG (30,7 meses) quando comparadas às novilhas 3/4HG (31,4), 15/16 HG (31,3) e 31/3HG (31,3), todas manejadas como animais puro da raça Holandesa.

Facó et al. (2005) avaliaram a idade ao primeiro parto do grupos genéticos 3/4 e 7/8 HG no Brasil entre os anos de 1989 e 2002 e verificou que não houve diferença entre eles, sendo 33 meses, tendo assim ficado gestantes com 24 meses de idade.

2.1.3.2 Nutrição, Idade e Ganho de Peso

Uma boa eficiência reprodutiva de novilhas depende da idade em que elas criam pela primeira vez (MARTIN et al., 1992). Aquelas novilhas que parem mais precocemente podem ter maior vida produtiva que aquelas que parem tardiamente. Assim a principal vantagem de em emprenhar as novilhas cedo é o menor tempo para obter o retorno do investimento, iniciando a produção e aumentando o número de crias (SHORT et al., 1994).

A maturidade sexual em novilhas depende mais do peso corporal que da idade. Segundo Foldager et al. (1988) 85% das novilhas entram em puberdade entre 200 e 300 kg de peso vivo, apenas 5% atingem a puberdade antes de 200 kg de peso vivo, e menos de 10% das novilhas apresenta o primeiro estro após 300 kg peso vivo. Entretanto, melhorias no plano nutricional influenciam no processo de maturação sexual (DAY et al., 1986; GARCIA et al., 2002), e culminam com aumento da frequência de pulsos de LH e tamanho máximo dos folículos no período pré-puberal (DAY et al., 1987). Neste sentido, a taxa de crescimento das novilhas tem considerável influência sobre a idade à puberdade e, conseqüentemente, ao primeiro parto (HOPKINS, 1989; FERREIRA 1991). Portanto, tem sido observado que a idade a puberdade é influenciada pelo nível nutricional recebido pelas bezerras durante o período pré-puberal, que, em baixo nível de energia a idade à puberdade é retardada (HOPKINS, 1989), e o aumento no nível de energia obtém novilhas púberes com menos de 300 dias de vida (GASSER et al., 2006a; GASSER et al., 2006b; GASSER et al., 2006c; GASSER et al., 2006d). Dessa forma, o ganho de peso corporal é inversamente correlacionado com a idade a puberdade, uma vez que o aumento no ganho de peso resulta em menor idade à puberdade da novilha (LAMOND, 1970; FOLDAGER et al., 1988).

Segundo Daccar et al. (1993), a idade à puberdade é dependente da nutrição, que está diretamente relacionada com o peso vivo (idade fisiológica) e não com a idade cronológica do animal. No entanto, o peso e a idade à puberdade variam de acordo com a raça e, o nível energético da dieta ao qual a bezerra é submetida, sendo a principal causa dessa variação (HOPKINS, 1989).

A idade a puberdade e conseqüentemente o primeiro estro de novilhas zebuínas variam de acordo com a intensificação de manejo da propriedade, principalmente o nutricional desses animais (FAJERSSON et al., 1991; FERREIRA, 1991; SOUZA et al., 1995; PEREIRA, 2000; NOGUEIRA et al., 2004; RUAS et al., 2004). Segundo Borges et al. (2015), a principal causa do baixo desempenho reprodutivo da maioria dos rebanhos leiteiros no Brasil é o aporte energético insuficiente das dietas fornecidas às novilhas. Na maioria das fazendas, o manejo nutricional de novilhas é negligenciado, o que resulta numa inatividade ovariana, atrasando a puberdade, causando elevação da idade ao

primeiro parto e aumento do intervalo de partos (FERREIRA e TEIXEIRA, 2000; BORGES e MARTINS, 2013).

A puberdade está mais relacionada com o desenvolvimento corporal do que a idade cronológica (MORAN et al. 1989; SCHILLO et al., 1992), e sem dúvida a nutrição é um fator importante influencia na idade ao início da puberdade (MORAN et al., 1989; ROBINSON, 1990; SCHILLO et al., 1992; GASSER et al., 2006a, b, c, d; BORGES et al., 2015).

Segundo Schillo et al. (1992), quando o manejo nutricional está adequado ao potencial de desenvolvimento das bezerras, há uma redução da idade de puberdade e da ocorrência do primeiro estro. Ainda, segundo os mesmos autores a puberdade das novilhas inicia quando elas atingem de 40 a 50% do peso vivo adulto, diferindo do National Research Council - NRC (2001), que considera a variação de 60 a 65% do peso vivo adulto.

A deposição de gordura corporal é um indicador do estado nutricional que se encontra o animal e, esta deposição de gordura corporal está diretamente relacionada com a idade à puberdade, por intermédio da leptina que atua sinalizando o estado corporal do animal ao hipotálamo (SPICER, 2001, VAICIUNAS et al., 2008). Segundo Leaflet (2001) as novilhas identificadas com o trato reprodutivo mais desenvolvido são também as que apresentam maior cobertura de gordura na garupa. A idade à puberdade diminuiu à metade (16,6 para 8,4 meses) quando Foldager et al. (1988) elevaram a taxa de crescimento das novilhas de 400 para 800 g diário.

O aumento da ingestão de energia e proteína de bezerras durante o período de aleitamento diminuiu a idade (31 dias) e o peso vivo (20 kg menos) no início da puberdade (DAVIS RINCKER et al., 2011). Shamay et al. (2005) sugerem que a dieta *ad libitum* de leite têm um efeito a longo prazo sobre o momento da puberdade em novilhas. Estes autores observaram que bezerras da raça holandesas alimentadas com leite integral *ad libitum*, ganharam 0,88 kg/dia, e atingiram a puberdade 23 dias antes (sem diferenças no peso vivo) que bezerras alimentadas com subcedâneos do leite, as quais ganharam 0,59 kg/dia durante o período de aleitamento. Raeth-Knight et al. (2009) demonstraram que bezerras alimentados com 21% de proteína e energia no sólidos totais de sucedâneo de leite tiveram maior peso corporal e pariram antes que bezerras

aleitadas com 13% de proteína no leite integral, sugerindo também um efeito a longo prazo de dieta de alta energia.

Yelich et al. (1996) estudando novilhas de corte de nove meses de idade até o início da puberdade, suplementadas com duas dietas (alto ganho ou baixo ganho) alimentadas durante 16 semanas, observaram que, as novilhas que receberam uma dieta de alta energia atingiram a puberdade mais cedo do que os animais na dieta de baixo ganho (369 ± 16 vs 460 ± 17 dias de idade respectivamente). Radcliff et al, (1997) avaliaram o efeito de duas dietas diferentes dos 120 dias de idade até a puberdade em novilhas da raça Holandês, uma dieta rica em concentrado (75% de grãos e 25% de silagem) e outra dieta controle (10% de grãos e 90% de silagem). As novilhas alimentados com a dieta rica em concentrado apresentaram a puberdade aos 266 ± 9 dias de idade, enquanto aquelas alimentadas com a dieta controle, a puberdade ocorreu aos 313 ± 10 dias de idade.

Bezerras desmamadas aos dois meses de idade e após, alimentadas com dietas de alta energia exibem maior frequência de pulsos de LH (GASSER et al., 2006d), acelera a maturação ovariana, demonstrado pelo aumento do diâmetro máximo dos folículos dominantes e aumento das concentrações de estradiol durante as ondas foliculares, em consequência da redução do feedback negativo do estradiol sobre a secreção de LH (GASSER et al., 2006c).

Ao comparar o fornecimento de duas dietas para novilhas (alta energia ou baixa energia), Cardoso et al. (2012) observaram que, aquelas que receberam alta energia na dieta apresentaram maior ganho de peso e uma maior frequência de pulsos de LH em oito meses de idade.

Embora os mecanismos moleculares entre nutrição e início da puberdade são muito complexos e não são completamente compreendidos, estudos mostram que alguns metabólicos auxiliam a promover sinalizações e desencadear esta fase reprodutiva. Pode-se incluir a insulina e IGF-I (SIMPSON et al., 1991; SULLIVAN e FELDMAN, 1994; OLSON et al., 1995; YELICH et al., 1996; ADAM e FINDLAY, 1998), e a leptina (GARCIA et al., 2003; MACIEL et al., (2004).

A insulina é secretada pelas células pancreáticas e desempenha um papel central no metabolismo do corpo, atuando como um marcador do estado de energia para o sistema nervoso central (SARTORI, et al., 2013). Além de atuar

como um potente estimulador da mitose, as concentrações fisiológicas de insulina são provavelmente necessária para a esteroidogênese folicular normal, em conjunto do FSH (BOSSIS et al., 1999; BUTTLER et al., 2004). Segundo Silva e Price (2002), quando as concentrações de insulina estão em cerca de 100 ng / mL há um aumento na secreção de E₂. Estudos com bezerras demonstraram que superalimentação durante um curto período (três semanas) aumentaram as concentrações de insulina e o número de folículos nos ovários (GUTIERREZ et al., 1997). Assim, a insulina tem um papel importante por atuar como um sinalizador para mediar os efeitos das alterações agudas na dieta sobre dinâmica folicular em bovinos (SARTORI et al., 2013).

O IGF-I circulante é produzido principalmente no fígado (MURPHY et al., 1987), e pode atravessar a barreira sangue-cérebro (REINHARDT e BONDY, 1994). Ojeda et al, (2008) propuseram que o IGF-I é um fator derivado das células da glia que estimulam a liberação de GnRH. Daftary e Gore, (2003) demonstraram que o IGF-I também é sintetizado nos neurônios produtores de GnRH. Estes neurônios contêm receptores de IGF-I que por sua vez promove uma estimulação na expressão e liberação de GnRH (OLSON et al., 1995), o que facilita o processo de puberdade (HINEY et al., 1991; HINEY et al., 1996). A expressão de IGF-I no cérebro é elevada durante a puberdade (SULLIVAN e FELDMAN, 1994). Quando novilhas foram alimentadas com alta energia na dieta houve um aumento nas concentrações de IGF-I comparadas àquelas alimentadas com uma dieta de baixa energia (RADCLIFF et al., 2004).

Jones et al. (1991) avaliaram as mudanças nas concentrações de GH e IGF-I em quatro diferentes raças de gado de corte (Angus, Braford, Charolês e Simental). As concentrações de IGF-I aumentaram nas novilhas da raça Angus a partir de -56 dias até o dia da puberdade, mas não nas outras raças. Anos mais tarde Yelich et al., (1996), estudando a idade à puberdade de novilhas de corte observaram que quando alimentadas com dieta para alto ganho as novilhas apresentaram maiores concentrações de LH, IGF-I e insulina durante os dias de tratamento do que as novilhas no tratamento de baixo ganho. Entre os tratamentos, as concentrações séricas de GH foram superiores na primeira semana antes do início da puberdade do que às três semanas antes da puberdade. Esses resultados sugerem que uma alteração nas concentrações de GH ocorre no início da puberdade e pode desempenhar um papel importante

neste processo. Os resultados deste estudo apoiam a hipótese de que a nutrição influencia mais que a idade cronológica na puberdade por meio da regulação das concentrações de IGF-I e GH que podem estar envolvidos na maturação final do trato reprodutivo da novilha.

Como relatado anteriormente a nutrição pode ser considerada umas das principais responsáveis pela puberdade de novilhas. Frisch., 1984 propôs que para o desenvolvimento puberal há a necessidade de um grau mínimo de adiposidade corporal. As concentrações circulantes de leptina estão correlacionadas positivamente com a adiposidade e os aumentos no peso corporal de novilhas (GARCIA et al., 2003). É no tecido adiposo que é produzida a leptina que desempenha papel importante na sinalização do estado metabólico e regulação da ingestão de alimento, gasto de energia e função reprodutiva (CHEHAB et al., 1996; FRIEDMAN e HALAAS., 1998). A leptina secretada pelos adipócitos pode ativar mecanismos hipotalâmicos, aumentando o número de picos de secreção de LH (FOSTER e NAGATANI, 1999; GARCIA et al., 2002). Em um estudo, Amstalden et al. (2000), observaram que a expressão do gene da leptina no tecido adiposo e concentrações de leptina circulante são reduzidos em 48 horas de jejum, causando a redução na frequência de pulsos de LH.

2.1.4 UTILIZAÇÃO DO SCORE DO TRATO REPRODUTIVO (ETR) COMO FATOR DE AVALIAÇÃO DA PUBERDADE

Meses antes e após a puberdade o trato reprodutivo de novilhas apresenta diversas alterações fisiológicas e morfológicas que permitirão o desenvolvimento da gestação. O tamanho e peso do ovário, útero, cérvix e vagina aumentam com a proximidade e após a puberdade (DESJARDINS e HAFS 1969, MONTEIRO et al., 2013). Usando o exame ultrassonográfico Honaramooz et al., (2004), observaram aumento na espessura dos cornos uterinos, bem como o aumento gradativo do maior folículo durante as semanas anteriores até o surgimento da puberdade. Sá Filho et al., (2008) observaram o desenvolvimento uterino pré e pós-puberdade de novilhas da raça Nelore e

relataram que este evento é decorrente da estimulação exercida pelo aumento das concentrações de E₂ e P4 durante o período pós-puberal.

Anderson et al. (1991) desenvolveram a avaliação do trato reprodutivo utilizando uma escala de 1-5, onde 1 é atribuído para aquelas novilhas que apresentam trato reprodutivo infantil e escore 5 para aquelas que apresentam corpo lúteo ativo e aptas a conceber. O escore 1 foi descrito para novilhas com trato reprodutivo sem tônus uterino e sem estruturas ovarianas palpáveis; já o escore 2 para aquelas que ovários apresentavam folículos >8mm nos ovários, um diâmetro de corno uterino entre 20-25 mm e sem tônus uterino. Já no escore 3, os ovários apresentam folículos com diâmetros entre 8-10 mm, apresentam tonus uterino e corno uterino com diâmetro entre 25-30 mm. No escore 4, as fêmeas apresentam diâmetro do corno uterino acima de 30 mm, sendo este com bom tônus, e ovários com folículos acima de 10 mm de diâmetro e possível presença de corpo lúteo. Por último, o escore 5 são aquelas novilhas que apresentam ciclicidade normal com corpo lúteo funcional.

A avaliação do escore do trato reprodutivo (ETR) de novilhas se tornou uma ferramenta muito útil e importante, praticada há décadas (LE FEVER e ODDE., 1986; Anderson et al., 1991; PENCE e BREDÁHI, 1998; HOLM et al., 2009) pelo veterinário, pois consegue fornecer uma avaliação subjetiva do estado de desenvolvimento puberal, já que subjetivamente fornece uma avaliação indireta da ocorrência da puberdade e excluiu aquelas novilhas que ainda não estão aptas à primeira cobrição ou estação de monta (LE FEVER e ODDE, 1986; PENCE e BREDÁHI, 1998; HOLM et al., 2015).

Tendo em vista que muitas das vezes se torna difícil e inviável financeiramente esta avaliação através das dosagens de progesterona circulante, o método de avaliação do ETR é a ferramenta útil devido ao diagnóstico via palpação retal (MARTIN et al., 1992). Segundo Holm et al. (2008) o ETR é uma ferramenta válida para tomada de decisões destinadas a melhorar o sucesso em programas reprodutivos a longo prazo, através da exclusão de novilhas que ainda não se tornaram púberes e possivelmente não acabaram sua primeira estação de monta gestantes.

Rosenkrans e Hardin (2003) em um estudo comparando a acurácia na avaliação do trato reprodutivo para a detecção da puberdade entre dois médicos veterinários utilizando a palpação retal e a técnica de ultrassonografia transretal

não observaram diferenças entre eles. Entretanto as duas avaliações foram capazes de identificar novilhas em pré-puberdade e puberdade.

2.1.5 FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese nos bovinos é um evento contínuo e se inicia ainda na vida fetal, passa pela puberdade e continua na vida reprodutiva até a senilidade (NILSSON et al., 2001). Ela caracteriza-se pela formação, crescimento e maturação folicular, originando a formação do folículo primordial e culmina com o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório (IRELAND, 1987).

A fêmea bovina apresenta, desde seu nascimento, aproximadamente 100.000 folículos primordiais nos ovários. Os folículos que constituem este *pool* de reserva podem permanecer em repouso, ou iniciar um processo irreversível de desenvolvimento o qual poderá ter dois destinos, sendo a ovulação ou, na maior parte das vezes, com a atresia (FINDLAY, 1994; ERICKSON e SHIMASAKI, 2001).

Segundo Campbell (1995) o período necessário para o folículo primordial alcançar seu tamanho pré ovulatório é cerca de 90 dias. O folículo primordial cresce até se tornar atrésico ou continua até a ovulação. Porém, ainda não são totalmente conhecidos os mecanismos que controlam o início e o número de folículos primordiais que começam a crescer (WEBB et al., 2004). Embora o crescimento folicular seja controlado principalmente através das gonadotrofinas e por fatores de crescimento produzidos localmente, vários fatores, sejam eles ambientais ou nutricional, podem influenciar o desenvolvimento folicular e a qualidade do oócito e, conseqüentemente, a fertilidade (GARNSWORTHY e WEBB, 1999; WEBB et al., 2003).

Com o surgimento da ultrassonografia nos anos 80, o processo de contínuo crescimento e regressão folicular, conhecido por dinâmica folicular, e estudado por Ginther et al. (1989), Driancourt (1991) e Fortune (1993).

O crescimento folicular é um fenômeno cíclico e depende da fase do ciclo estral (PIERSON e GINTHER, 1988). O crescimento dos folículos no ovário culmina na seleção de um único folículo dominante que atinge a capacidade para a maturação final e a ovulação, sendo uma ou duas vezes, durante a fase luteal,

e no final do ciclo do estro, bem como durante os outros estados reprodutivos (MIHM et al., 2002).

De acordo com Figueiredo et al. (1996), Gambini et al. (1998) e Bó et al. (2000) ocorrem variações no número de ondas foliculares de mesma espécie ou até no mesmo animal, podendo haver duas ou três ondas, ou até mesmo, mas com menor frequência, quatro ondas foliculares.

Durante o crescimento folicular inicial (recrutamento) os folículos sintetizam hormônios (inibina e estradiol), os quais reduzem a secreção de FSH pela hipófise (GIBBONS et al., 1997). Dos vários folículos recrutados, geralmente apenas um continuará o seu crescimento e chegará a dominância (LUCY et al., 1992), conhecido com fase de dominância folicular.

Após o desvio folicular (divergência) o FD continua seu crescimento sob influência e ação do LH, até que haja tamanho suficiente para chegar à ovulação. Porém quando há elevada concentração plasmática de P4 o folículo pré ovulatório entra em atresia por haver inibição da frequência de LH (GINTHER, et al., 2003).

Após a atresia, uma nova onda folicular inicia-se, chegando novamente um folículo primordial à dominância e tornar-se pré ovulatório (WEBB, et al., 1999). Este FD só irá ovular se houver luteólise e conseqüentemente a redução das concentrações plasmáticas de P4, o qual possibilitará o aumento da frequência no pulsos de LH (FORTUNE et al., 2004).

A fisiologia reprodutiva de vacas zebuínas é diferente de vacas taurinas, entretanto, as diferenças relatadas estão nas características como área de tecido luteal, baixa capacidade de secretar LH, diâmetro do folículo dominante, duração do estro e diâmetro folicular no momento da divergência e na ovulação (FIGUEIREDO et al., 1997; PINHEIRO et al., 1998; PATHIRAJA et al., 1986).

2.1.6 PUERPÉRIO E RETORNO DA ATIVIDADE OVARIANA

Puerpério ou período pós-parto compreende desde o nascimento do bezerro até a completa involução uterina e o restabelecimento da atividade cíclica ovariana (McENTEE, 1990). Durante o puerpério, o correto funcionamento do eixo hipotalâmico -hipofisário-ovariano-uterino permite que a

retomada na secreção dos hormônios gonadotróficos e gonadal, e conseqüentemente no retorno da ciclicidade da vaca levando à primeira ovulação pós-parto seja regular e dentro da normalidade (WILLIAMS, 1990).

No momento do parto ocorre queda abrupta das concentrações de P4 e estradiol na circulação, promovendo desta forma o feedback negativo no eixo hipotalâmico–hipofisário permitindo um restabelecimento gradual de suas atividades (NETT, 1987). No entanto, a fisiologia envolvendo a via eixo hipotálamo-hipófise- ovário no pós-parto é influenciada pelo estado nutricional, pelo estado energético em que se apresenta o animal.

Vacas em BEN deixam de destinar os nutrientes para a reprodução (BAUMAN e CURIE, 1980; LEROY et al., 2008), limitando o número de folículos, o crescimento e o tamanho máximo do folículo dominante no ovário, atrasando a primeira ovulação, prejudicando a ovulação e os sinais de estro.

Britt (1992) sugeriu que a menor taxa de concepção em vacas de leite de alta produção, é explicada por efeitos do BEN no início da lactação, na qualidade dos folículos, influenciando na menor qualidade do oócito e na quantidade de P4 secretada pelo corpo lúteo. Quando os folículos são expostos a condições adversas bem como: BEN, estresse térmico, doença metabólica, durante o seu desenvolvimento (sabendo que a foliculogênese dura aproximadamente 90 dias), os efeitos adversos sobre a qualidade do oócito ocorreriam de 40 a 60 dias seguintes, quando estariam ovulando, gerando queda nos índices reprodutivos, devido ao atraso da primeira ovulação, falha na concepção, tanto pelas concentrações inadequadas de P4, como pelo efeito negativo causado no oócito liberado após a ovulação.

A taxa de concepção aumenta com o decorrer dos ciclos, sendo provável que haja uma relação com a melhora do perfil de P4 (LUCY 2001). A retomada dos ciclos ovulatórios está associada a uma elevação de IGF-I plasmático, que está ligado ao estado nutricional, concentração de insulina e BEN, que vai determinar os pulsos de LH e a função ovariana (SANTOS, 2005).

A baixa ingestão de energia inibe o comportamento estral, pois reduz a responsividade do sistema nervoso central ao estradiol, devido a uma redução do número de receptores no hipotálamo (MILLEMAN et al., 1999).

Quando se tem uma privação de energia há uma redução da frequência e pulsos de LH, comprometendo a maturação do folículo e a ovulação. Segundo

KENDRICK et al. (1999), vacas com melhor balanço energético possuem concentrações intra-foliculares maiores de IGF-I e plasmático de P4, e portanto, são animais capazes de produzir oócitos de boa qualidade. No entanto, os folículos dominantes não atingem a maturação terminal, devido à ausência de um padrão adequado de secreção de LH, ocorrendo desta a forma sua atresia (YAVAS e WALTON, 2000).

Vários fatores e sinais, tanto extra ovarianos como reguladores intra-foliculares autócrinos e parácrinos regulam o crescimento folicular para que o folículos passem a atingir a dominância e assim ovular (WEBB et al., 2008).

No início da lactação, o período de transição (acometido dentre as três primeiras semanas após o parto) é necessário para que ocorra a involução uterina, reposição dos estoques hipofisários de LH e iniciação do crescimento folicular em ondas normais e, tendo uma necessidade do aumento de ingestão de matéria seca para equilibrar os níveis metabólicos (BUTLER, 2008).

O controle das fases finais da foliculogênese está relacionado principalmente com as gonadotrofinas (FSH e LH) e a expressão de fatores de crescimento modulam a ação das gonadotrofinas durante essa fase de desenvolvimento folicular (WEBB et al., 1999).

Chagas et al. (2007) relataram que a associação negativa entre o ECC no parto e o dia para primeiro cio reflete com atraso no retorno da atividade ovariana, pulsos de LH infreqüentes, respostas foliculares baixas para gonadotrofinas, e reduzida capacidade funcional do folículo.

O anestro pós-parto em vacas leiteiras está associado a uma inadequada frequência de pulsos de LH, que é caracterizado por uma depleção nos suas concentrações circulantes, que parece ser mais extremo em primíparas, de modo a aumentar o intervalo a primeira ovulação (DRACKLEY, 1999).

Segundo Santos (2005), as alterações no metabolismo durante o período de BEN podem influenciar folículos pré-antrais destinados a ovular mais tarde, gerando um impacto sobre a qualidade e viabilidade do oócito e do CL resultante daquela ovulação. O surgimento de ondas foliculares ocorre rapidamente depois do parto (BÓ et al., 2003), estas ondas são caracterizadas por um rápido aumento das concentrações séricas de FSH, seguido pelo aparecimento da primeira onda de crescimento folicular, entre 2 a 7 dias pós-parto (WILTBANK, 2002). Segundo Nett (1987) o aumento gradativo nas concentrações de FSH na

primeira semana pós-parto é devido provavelmente pela redução das concentrações de estradiol (NETT, 1987).

Raramente vacas ovulam na primeira onda folicular pós-parto. Vacas da raça Holandesa, a ovulação acontece em média aos 33 dias pós-parto. Entretanto dentre esse período ocorre uma média de 4,2 ondas foliculares antes da primeira ovulação, sendo este fato atribuído ao BEN e aos pulsos de infrequentes de LH (BEAM e BUTLER, 1998).

Segundo Nett (1987), os estoques hipofisários de FSH demoram cerca de cinco a sete dias para serem repostos, enquanto que os de LH demandam um período maior, cerca de 25 a 30 dias, com isso no pós-parto imediato com a liberação imediata de FSH logo inicia uma nova onda folicular porém o destino do folículo dominante pode não ser a ovulação por não haver a reposição nos estoques de LH.

Com o aumento da pulsatilidade de LH há um estímulo da maturação do folículo dominante, que produzirá o estradiol até um limiar pra desencadear o pico de LH. Segundo Lucy (2000), a duração do anestro pós-parto depende da condição corporal e do nível de BEN que o animal se encontra, pois vacas em BEN tem concentrações séricas de insulina, IGF-I mais baixos que, influenciam na secreção de GnRH e LH, metabólicos e hormônios que, estes também podem atuar sobre o ovário para influenciar a sensibilidade do ovário ao LH.

2.1.7 CICLOS CURTOS

Em vacas leiteiras também está relacionado um problema denominado “ciclos curtos”, caracterizado pela regressão prematura do corpo lúteo proveniente da primeira ovulação pós-parto, causando alteração do ciclo, ocorrendo devido a liberação prematura de prostaglandinas F2 α pelo endométrio (COPELIN et al.,1989).

O primeiro ciclo estral pós-parto de uma vaca geralmente é irregular, caracterizada pelo fato da ovulação ocorrer sem que os animais apresentem sinais de estro, pois pode haver lise precoce do corpo lúteo e menores concentrações séricas de progesterona (MCDOUGALL, 1995).

A primeira ovulação pós-parto geralmente ocorre sem as manifestações clínicas típicas de cio, sendo denominado cio silencioso e é seguida por um ciclo curto de oito a 12 dias, acompanhado de um corpo lúteo de menor tamanho e concentrações sub-luteais de P4 (PERRY et al., 1991) e de apenas uma onda folicular (MURPHY et al., 1990, FERREIRA et al, 2007).

De acordo com GUILBAULT et al. (1987) o útero no evento do pós-parto produz maiores quantidades de PGF2 α , e quando ocorre a primeira ovulação, não havendo uma prévia exposição à P4, esta maior concentração de PGF2 α lisa o corpo lúteo assim que o mesmo torna-se responsivo, resultando assim a fase lútea curta (RIVEIRA et al., 1998).

As altas concentrações plasmáticas de P4 aumentam progressivamente nos três primeiros ciclos estrais da vaca no período do pós-parto e esse aumento gradativo pode ser diminuído em virtude do BEN que o animal se apresenta nesta fase (SPICER et al, 1990).

2.1.8 QUALIDADE DO OÓCITO

Os fatores de crescimento, tais como o IGFs são responsáveis pelo desenvolvimento inicial dos folículos (ARMSTRONG et al., 2003), enquanto que as gonadotrofinas (FSH e LH) são importantes no crescimento final (WEBB et al., 2004).

Durante o período de crescimento folicular o oócito passa por alterações e reinicia a divisão meiótica, induzido por fatores sintetizados pelas células da granulosa e da teca (CECONI, 2004). Acredita-se desta forma que a qualidade do oócito, que ali se desenvolve pode ser influenciada por fatores capazes de modificar o ambiente folicular, tal como a nutrição. Os dados da literatura fazem acreditar que a nutrição pode afetar a foliculogênese, vindo a crer que desta mesma forma também possa haver alteração na capacidade e qualidade do oócito (LEROY et al., 2005, 2006 2008).

Dietas fornecidas com altos teores de energia podem afetar o desenvolvimento embrionário inicial, pois é comum estar relacionado com alteração no crescimento folicular e na divisão meiótica do embrião (LEROY et al, 2008). Segundo Armstrong et al. (2001), baixas taxas de desenvolvimento

pós fecundação são mencionados em ruminantes com dietas de alto plano nutricional, prejudicando a qualidade do oócito. Porém, não sabem quais são as alterações sofridas pelo fluido folicular que possam causar modificações no citoplasma do oócito que deixa sua viabilidade comprometida.

Entretanto, levando em consideração que a foliculogênese leva em torno de 60 a 90 dias e os folículos que iniciam o seu desenvolvimento, durante o BEM, os mesmos são afetados e liberam oócitos de baixa qualidade (BRITT, 1991).

Webb et al. (2004) afirmam que fatores de crescimento e hormônios extra ovarianos estão envolvidos nos mecanismos os quais a dieta poderia interferir na qualidade do oócito.

Novilhas com altos teores de energia na dieta podem apresentar uma melhora no número de folículos. Por outro lado, em vários estudos é demonstrado que dietas altamente energéticas diminuem a resposta aos protocolos de superovulação, diminuem a produção embrionária e alteram a taxa de clivagem e a de blastocisto quando comparada com novilhas com baixo teor de energia na dieta (NOLAN et al., 1998) relacionado com a produção de oócitos com qualidade comprometida (DUNNE et al., 1999; YAAKUB et al., 1999).

Kendrik et al (1999) afirmam que o BEN também é um fator que afeta a qualidade de oócitos, pois em seu estudo vacas que receberam menor teor de energia e que estavam em maior BEN produziram baixo número de oócitos de boa qualidade.

2.1.9 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

O primeiro registro de fecundação *in vitro* de embrião bovino foi em 1981. Brackett et al. (1982) recuperaram cirurgicamente oócitos maduros de ovários e ovidutos de vacas estimuladas por hormônio terapia. Os oócitos foram fertilizados *in vitro* e transferido cirurgicamente para uma vaca receptora resultando em 1981 o nascimento do primeiro bezerro de fecundação *in vitro*.

Anos mais tarde, com o domínio da técnica de interpretação de imagens ultrassonográficas na espécie bovina (KASTELIC et al., 1990) e posterior entendimento do sincronismo das ondas foliculares na espécie (GINTHER et al., 1989), houve um enorme avanço no conhecimento da fisiologia reprodutiva, o

que facilitou o emprego de biotecnologias da reprodução como: inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transferência de embrião (TE) e aspiração folicular guiada por ultrassom, seguida da produção *in vitro* de embriões (PIVE). Pieterse et al. (1988), por sua vez, descreveram a técnica de aspiração folicular (OPU) por via transvaginal através da ultrassonografia. Após avaliações, a técnica mostrou-se simples e de fácil aplicação, viabilizando a recuperação, maturação e fecundação de oócitos podendo ser repetidas várias vezes em um curto espaço de tempo em uma mesma fêmea (SALES et al., 2015), podendo ser utilizadas em fêmeas pré-púberes e até mesmo gestantes (KRUIP et al., 1994; BUNGARTZ et al., 1995).

Comercialmente, as técnicas de OPU e PIVE consistem em recuperar oócitos de animais considerados geneticamente superiores, onde são transferidos por técnica não cirúrgica ou até mesmo serem submetidos ao congelamento para posterior transferência (BOLS et al., 2004; PONTES et al., 2010). Segundo International Embryo Transfer Society (IETS; 2013), o Brasil é o país que mais se produz embriões no mundo, a PIVE produziu cerca de 318 mil embriões em 2011, o equivalente a 86% da produção mundial de embriões *in vitro*.

Além da ampla contribuição no melhoramento genético que a PIVE promove, sua importância vai além do interesse comercial, pois tornou-se uma ferramenta que permite estudar mais rapidamente e exatidão a fisiologia de fêmeas bovinas. Há um enorme avanço em estudos envolvendo nutrição e reprodução tornando as perguntas mais rapidamente respondidas comparados com estudos pioneiros. Modelos *in vitro* tem dado uma riqueza de informações (LEROY et al., 2014), é possível avaliar o efeito direto do indivíduo e combinações (simulações) incrementando metabólitos que possam interferir o oócito e o desenvolvimento embrionário inicial (LEROY et al., 2005; WONNACOTT et al., 2010; VAN HOECK et al., 2011; OBA et al., 2013). Através da punção folicular é possível coletarmos o fluido de um folículo e estudarmos seus metabólitos e hormônios (MCDOWALL et al., 2014; SALES et al., 2015), bem como a influência da nutrição na qualidade de oócitos e na produção de embriões (LEROY et al., 2005; LEROY et al., 2010).

O sucesso da produção *in vitro* de embriões está diretamente relacionado ao número e qualidade de COCs que são destinados ao cultivo (VIANA e BOLS,

2005). Fatores que influenciam a quantidade e a qualidade dos oócitos obtidos por sessão de aspiração, conseqüentemente a competência para a produção embrionária é a fase do ciclo estral (VASSANA et al., 2003).

Segundo Sirad et al. (2006), a competência oocitária pode ser caracterizada por alguns eventos-chave, como por exemplo; o reinício da meiose, a ativação da clivagem após a fertilização, o desenvolvimento ao estágio de blastocisto, entre outros. Porém o mais empregado para determinar esta característica é o desenvolvimento a blastocisto, uma vez que os oócitos incompetentes são bloqueados na transcrição materno- zigótico, que ocorre no estágio de oito células (SIRARD et al., 2006).

Outro parâmetro de avaliação da competência dos oócitos é o diâmetro dos folículos, onde estes possuem efeito sobre a capacidade dos oócitos para prosseguir como desenvolvimento *in vitro* até blastocisto. Folículos a partir de 3 mm de diâmetro já tem a capacidade de realizar a ativação nuclear. Sendo assim, o oócito gradualmente adquire a capacidade se sofrer a maturação, meiose e manter o desenvolvimento embrionário (HYTTEL et al., 1997; RIZOS et al., 2005). Machatkova et al. (1996) relataram que folículos no intervalo de 2 a 7 mm produzem oócitos que são mais competentes, o que resulta em maiores taxas de clivagem e um maior número de blastocistos.

A capacidade de desenvolvimento de oócitos entre os dias 80 a 120 do pós-parto é baixa (KRUIP et al., 1996). O estágio de lactação também apresenta efeitos sobre a população folicular (MURPHY et al., 1990). Os autores observaram que o recrutamento e o crescimento dos folículos aumentaram com o decorrer dos dias pós- parto. Gwazdauskas et al. (2000) observaram um aumento gradual na qualidade dos oócitos com o decorrer do pós-parto. Os autores ressaltam ainda um aumento de 2% na qualidade do ócitos aos 30 dias, 10% ao 48 dias e diminuindo para 4,1% o aumento aos 117 dias de pós-parto.

Ainda existe uma influência do grau genético da doadora sobre as taxas de recuperação de oócitos. Animais *Bos indicus* (raça Gir) apresentam diferenças na fisiologia ovariana, quando comparados aos *Bos taurus* (Holandês), como maior número de ondas de crescimento folicular (FIGUEIREDO et al., 1997; VIANA et al., 2000), menor persistência e diâmetro do folículo dominante no momento da divergência (SARTORELLI et al., 2005;

VIANA et al., 2010) e maior número de folículos por onda de crescimento (VIANA et al., 2000).

Pontes et al. (2010) relataram diferenças entre animais das raças Gir, Holandesa e seus cruzamentos. Os autores relataram uma maior recuperação e maior taxa de oócitos viáveis para as doadoras 1/2 HG (31,4 oócitos recuperado sendo 24,3 considerados viáveis), em relação às doadoras da raça Gir (17,1 oócitos recuperado sendo 12,1 considerados viáveis) e da raça Holandês (11,4 oócitos recuperados, sendo 8,0 considerados viáveis).

Sales et al. (2015), em nove aspirações a cada 14 dias em vacas da raça Gir recuperaram em média 22,8 oócitos. A taxa de recuperação foi 88,8% e média de oócitos viáveis de 19,3. Vacas da raça Holandesa apresentaram menor desempenho, com 14,8 oócitos recuperados, 60,4% de taxa de recuperação e 10,8 oócitos viáveis. Ainda, Sales e seus colaboradores (2015), ao avaliarem a influência da dieta (alta e baixa energia) em vacas de leite não lactantes, não observaram diferenças na taxa de recuperação de oócitos, no número de oócitos viáveis, nem na qualidade oocitária.

2.1.10 PERÍODO DE TRANSIÇÃO

Diversas alterações são observadas no metabolismo das vacas leiteiras entre o final da gestação e o início da lactação. Este período é denominado de período de transição, sendo definido como a fase entre as três semanas que antecedem o parto e as três primeiras semanas de lactação (DRACKLEY, 1999).

O período de transição continua sendo uma problemática dentro dos rebanhos leiteiros, resultando em importantes perdas econômicas. O desequilíbrio nutricional que ocorre nesse período afeta diretamente o desempenho produtivo e reprodutivo (DRACKLEY, 1999; HAYIRLI et al., 2002; MULLIGAN e DOHERTY, 2008).

Este período está associado com uma grande incidência de doenças, que podem comprometer a fertilidade dos animais. Embora tradicionalmente considerado como distúrbio metabólico de vacas leiteiras, as doenças como retenção de placenta, endometrite, febre do leite, mastite, e claudicação são

influenciadas pela alta produção de leite da vaca e uma má conduta nutricional desses animais (KOSSAIBATI e ESSLEMANT, 1997; MULLIGAN e DOHERTY, 2008). A diminuição na ingestão de energia, vitaminas e de minerais no periparto, influenciados pelas mudanças dramáticas nas concentrações circulantes de progesterona e estrogênio, contribuem para um BEN, pois haverá a mobilização de tecido adiposo, para suprir as carências principalmente de energia exigidas para produção de leite (GOFF e HORST, 1997; INGVARTSEN, 2006).

Nesses períodos, a energia ingerida é priorizada para a manutenção e produção de leite, em detrimento das funções reprodutivas (MONTIEL e AHUJA, 2005). Entretanto, Drackley (1999) afirma que esse período corresponde ao limite biológico dos processos metabólicos na vaca leiteira, caracterizado pela dramática alteração metabólica e fisiológica pelas quais o animal atravessa, e que ocorrem paralelamente à involução uterina e ao reinício da atividade ovariana.

A vaca sai no período seco e após o parto inicia a lactação com um aumento repentino na demanda de energia para a produção de leite (BAUMAN e CURRIE, 1980; GRUMMER, 1995). Nesta fase, a ingestão de matéria seca não supre a alta demanda de energia destinada para a produção de leite. Conseqüentemente, a maioria das vacas nesse período apresenta um BEN, podendo ser mais acentuado dependendo do indivíduo, da raça ou do cruzamento (GRUMMER, 1995; Aguilar-Pérez et al., 2014).

O período de transição, contudo, é de elevada e fundamental importância para a reprodução da vaca (PETER et al., 2009). González (2002) ressalta que os dois primeiros meses pós-parto são os mais críticos para vacas leiteiras, principalmente as de alta produção. O consumo de alimento não se faz suficiente para a demanda de nutrientes necessários para o metabolismo, principalmente energético, destinados à síntese do leite. Assim, as vacas tendem a perder peso e escore de condição corporal, em um período crítico para a reprodução, quando ocorre a involução uterina e o retorno à atividade ovariana. Esse período de balanço energético negativo pode se estender pelos primeiros 42 dias pós-parto (HÜTTMANN et al., 2009).

Segundo Leroy et al., (2014), mesmo suplementando a dieta com diversas fontes de gordura não se consegue impedir o BEN durante o período de transição em vacas leiteiras de alta produção. Por outro lado, esta

suplementação pode ser uma boa estratégia para estímulo à síntese de estrógeno e ter como consequência um melhor crescimento folicular.

2.1.11 CONSUMO DE MATÉRIA SECA

Vários mecanismos estão inter-relacionados à ingestão de alimento (VAN SOEST, 1994). O consumo alimentar voluntário do animal é regulado por três mecanismos: o fisiológico, em que a regulação é fornecida pelo balanço nutricional; o psicogênico, que envolve a resposta do animal a fatores inibidores ou estimuladores, relacionados ao alimento ou ao ambiente; e o físico, relacionado à capacidade de distensão do rúmen, que pode influenciar a taxa de passagem e a taxa de digestão dos alimentos (MERTENS, 1992).

O desempenho animal pode ser interpretado pelo reflexo da qualidade da forragem, pelo seu valor nutritivo e o consumo de matéria seca (MS) (REIS et al., 2009). O ingresso de nutrientes, principalmente de energia e proteína, necessários para o atendimento das exigências de manutenção e produção, está diretamente ligado à ingestão de matéria seca, sendo um dos fatores determinantes do desempenho animal (NOLLER et al., 1996).

Quando vacas são mantidas sob regime de pastejo pode haver um consumo deficiente de matéria seca (MS) digestível. A baixa digestibilidade dessas forrageiras determina que o consumo de matéria seca de vacas em pastejo não ultrapasse os 2% de seu peso vivo resultando em uma baixa produção de leite (VASQUEZ, 2002). Esse limite é determinado pelo alto conteúdo de fibra e baixa digestibilidade da forragem (ALVIM et al., 1999).

Grummer e Rastani (2004) ressaltam que nas últimas três semanas de gestação há uma redução de aproximadamente 30% no consumo alimentar. Antes dessas três semanas o consumo de matéria seca (CMS) em vacas multíparas é de 1,9% do peso vivo, período que começa uma redução, chegando no dia anterior ao parto à um consumo de 1,3% do peso vivo. Similar o que acontece em vacas, estes autores afirmam que novilhas apresentam uma diminuição no CMS de 1,7% para 1,3% do peso vivo aos 21 dias pré-parto e um dia antes do parto, respectivamente.

Quando há redução de CMS, pouco propionato é produzido no rúmen, sendo este ácido graxo de cadeia curta o principal precursor de glicose em ruminantes (FERNANDES et al., 2012) reduzindo assim a glicose circulante. Com a condição de hipoglicemia, o organismo reduz a produção de insulina; e assim o organismo passa a entender que falta energia e que há necessidade de mobilizar reservas corporais. Portanto, as mudanças nas concentrações hormonais antes do parto associada à queda das concentrações circulantes de insulina e glicose promovem a mobilização do tecido adiposo e a liberação de ácidos graxos livres e glicerol (POGLIANI et al., 2010). O nutriente precursor que sustenta a síntese de lactose do leite e em sequência a própria produção de leite é a glicose. De acordo com Lago et al., (2004), cerca de 80% do requerimento total de glicose é destinada à síntese de leite.

A energia é o parâmetro mais limitante da nutrição de bovinos leiteiros, já que é o nutriente mais requerido e mais difícil de ser suprido através da dieta, principalmente no início da lactação (FUCK et al., 2000). Imediatamente após o parto, há uma alta exigência energética e proteica para a síntese de leite, enquanto que a ingestão de alimentos não aumenta na mesma proporção, sendo insuficiente para suprir tais exigências. Para isso, há mobilização de energia e proteína, sendo estas retiradas e mobilizadas das reservas corporais. Sendo assim uma alternativa é fornecer os nutrientes necessários para a produção de leite durante as primeiras semanas da lactação (JUCHEM et al., 2004).

Mesmo que fracionada, a suplementação concentrada pode representar elevada ingestão de carboidrato/proteína rapidamente degradáveis no rúmen, implicando em eventuais distúrbios digestivos/metabólicos, caso haja acúmulo de amônia e ácidos, pela insuficiente utilização/remoção do rúmen (PEREIRA e ARMENTANO, 2000). Além disso, o fornecimento de quantidades elevadas de concentrados ricos em carboidratos não estruturais pode provocar queda no teor de gordura do leite, depressão na degradabilidade da fibra, acidose e redução do CMS. A inclusão de lipídeos insolúveis na dieta pode evitar estes distúrbios (VAN SOEST, 1994).

2.1.12 ESCORE DA CONDIÇÃO CORPORAL

Sabe-se que a combinação da mobilização das reservas corporais e ingestão de energia tem uma grande influência sobre as vacas leiteiras, principalmente sobre a produtividade, saúde e reprodução. A avaliação da condição corporal é a ferramenta comumente utilizada para estimar o balanço energético de vacas em lactação. Trata-se de uma ferramenta importante utilizada para avaliar níveis de reserva corporal de gordura, sendo a melhor prática de avaliação que expressa o “status” nutricional dos animais (SATURNINO e AMARAL, 2004). A perda de condição corporal é consequência da mobilização das reservas corporais influenciada pelo BEN das vacas entre o parto e o pico de lactação. Esta mudança na condição corporal é de fundamental importância, já que os efeitos subsequentes são notáveis para a reprodução (LEBLANC, 2010; VON LEESEN et al., 2014)

A maioria das vacas leiteiras mobiliza reservas corporais de gordura no pré-parto e início da lactação, que são recuperadas com o decorrer da lactação e, especialmente, ao longo da gestação (FRINGENS et al., 2004).

Portanto, através do monitoramento do ECC, é possível estimar o BEN, o principal evento da fase de transição de uma vaca de alta produção. Entre os diferentes métodos de avaliação do ECC, o mais fácil e mais amplamente utilizado é o desenvolvido por Edmonson et al. (1989), exame internacionalmente aceito para prever o estado nutricional de vacas, principalmente aquelas de alta produção (BERRY et al., 2007). É um método não invasivo, subjetivo e rápido, baseado em avaliações visuais e táteis das reservas corporais em pontos específicos do corpo da vaca, em uma escala de 1 a 5, com subunidades de 0,25 pontos, na qual 1 equivale a uma vaca magra e 5 uma vaca extremamente gorda (EDMONSON et al., 1989). Para o monitoramento de vacas mestiças *Bos taurus* x *Bos indicus*, Ruas et al., (2000) criou uma escala simples de 3 a 5 adotando o mesmo princípio: 3 equivale a uma vaca magra e 5 uma vaca gorda.

Eventos fisiológicos como, por exemplo o BEN, composição e produção de leite e eficiência reprodutiva em vacas leiteiras são amplamente relacionados ao ECC que por sua vez é consequência do CMS (BUTLER, 2000).

Até o primeiro terço de lactação, a produção de sólidos totais do leite são produzidos a partir de reservas do tecido adiposo (BAUMAN e CURRIE, 1980). O ECC também afeta a produção de gordura no leite. Segundo Pedron et al.

(1993), a maior porcentagem de gordura no leite de vacas com alto ECC ao parto foi atribuída à maior mobilização de gordura corporal na fase inicial da lactação, que proporciona concentração elevada de ácidos graxos não esterificados na circulação. Esses ácidos graxos podem ser utilizados diretamente pela glândula mamária, juntamente com outros nutrientes provenientes da dieta para síntese de gordura do leite.

Outros estudos também apontam que quando o ECC é baixo há uma diminuição da fertilidade (MOREIRA et al., 2000; SOUZA et al., 2008; SANTOS et al., 2009; CARVALHO et al., 2014). A perda excessiva de ECC entre o parto e primeira inseminação está associada com baixo desempenho reprodutivo (LÓPEZ-GATIUS et al., 2003., SANTOS et al., 2009). Segundo Britt (1992), o status de energia do animal durante o período pós-parto precoce pode alterar a qualidade folicular e conseqüentemente a do oócito, resultando em efeitos negativos sobre a subsequente fertilidade de vacas leiteiras em lactação.

Além de afetar o desempenho produtivo, fêmeas que perdem mais de uma unidade de ECC numa escala de 1-5 após o parto podem reduzir também o desempenho reprodutivo devido atraso do retorno da atividade ovarina (CROWE, 2008), influenciado pela depressão da frequência de GnRH e LH pela hipófise (GRIMARD et al., 1995; MEIKLE et al., 2004).

Das vacas de primeira cria que perdem ECC do parto até os 21 dias após o parto (2.83 – 2.54) somente 30,8% ficam gestante. Aquelas fêmeas que mantêm o ECC (2.84 – 2.84) tendem a 46,9% ficarem gestantes e aquelas que ganham ECC (2,76 – 3,01) tendem a 85,8% de ficar gestante aos 84 dias pós-parto (CARVALHO et al., 2014). Os mesmos autores relatam que o intervalo médio entre parto e concepção foi de 84, 113 e 128 dias para aquelas vacas que ganharam, mantiveram e perderam ECC, respectivamente. Além disso, as vacas que ganharam ECC entre parto e os 21 dias pós-parto tiveram 3,0 e 2,5 vezes mais probabilidade de conceber aos 300 dias de lactação em comparação com as vacas que perdeu e manteve o ECC, respectivamente.

Estudos mostram ainda que o ECC tem efeitos na qualidade de oócitos de primíparas. O baixo ECC não interfere na taxa de recuperação de oócitos, mas afeta o seu desenvolvimento *in vitro*, representado por menores taxas de clivagem e blastocistos (MEE et al., 2000). Baixos ECC influenciam as

concentrações de hormônios importantes, como o IGF-I, a insulina e a leptina, hormônios que afetam o desenvolvimento oocitário (ADAMIÁK et al., 2005).

2.1.13 BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO (BEN)

No início da lactação, existe uma incompatibilidade entre CMS e energia necessária para a produção de leite e de manutenção do animal, ou seja, há um BEN. É sabido que a produção de leite por animal vem melhorando ao longo das últimas décadas (LUCY, 2001), sucesso do melhoramento genético para essa característica. Porém, o sucesso da seleção para alta produção de leite tem sido acompanhado por efeitos negativos, especialmente sobre o balanço energético negativo, o qual é agravado no início da lactação.

De acordo com Collard et al. (2000), a seleção para características de produção de leite resultou em uma mudança de energia disponível para a produção de leite chegando ao ponto de o consumo de matéria seca torna-se insuficiente para a demanda no início da lactação. As necessidades nutricionais mudam abruptamente ao parto e no início da lactação, onde as vacas não são capazes de compensar essas crescentes demandas de energia só pelo consumo alimentar, resultando em BEN. Este BEN que começa alguns dias antes do parto e, geralmente, atinge o seu nível mais negativo cerca de duas semanas mais tarde, leva a necessidade de uma energia adicional para a produção de leite, sendo esta necessidade proveniente da mobilização de gordura corporal e do músculo esquelético (BUTLER e SMITH, 1989; BELL, 1995).

Inúmeros prejuízos são relacionados ao BEN em vacas de leite. Segundo Walsh et al. (2011), o primeiro passo a ser tomado para a combater as causas de infertilidade em vacas de alta produção é minimização do BEN. Entretanto, segundo Alvarenga, et al. (2015) medidas corretas de manejo nutricional e conforto animal (densidade animal, espaço de cocho, climatização) demonstram ser alternativas a serem tomadas para que as vacas apresentem um BEN discreto, diminuindo os transtornos negativos que o BEN causa.

Vacas em BEN são mais propensas a desenvolver determinadas patologias como: cetose, mastite, retenção de placenta e deslocamento de

abomaso, prejudicando assim a produção de leite e fertilidade (MULLIGAN e DOHERTY, 2008). Neste período, observa-se redução nos teores de gordura e proteína do leite e, principalmente, a relação entre gordura:proteína (GRIEVE et al., 1986; HEUER et al., 2001; FRIGGENS, et al., 2007; BUTTCHEREIT et al., 2010).

O BEN causa redução na fertilidade (ROCHE et al., 2009), interfere na redução de sinais de estro e baixa resposta à sincronização do estro, o que pode ser devido ao crescimento inconsistente e desenvolvimento prejudicado dos folículos (LUCY et al., 1992). De fato, para muitos pesquisadores o BEN é a razão do atraso da retomada da atividade ovariana luteal cíclica no pós-parto (COLLARD et al., 2000; LUCY, 2001). Bauman e Currie (1980) demonstraram que um balanço energético moderado ou elevado apresentou rendimento negativo durante o primeiro terço (100 dias) de lactação em vacas leiteiras. Autores ainda mostraram que o momento da primeira ovulação é implicado pelo BEN, que ocorre em média aos 30 dias pós-parto, mas as vacas podem ovularem entre 17 e 42 dias pós-parto (BUTLER e SMITH, 1989, BUTLER, 2000).

Segundo Banos e Coffey, (2010) o status energético do animal é impulsionado principalmente pelo indivíduo, através do CMS pelo mesmo. Os autores observaram que as vacas produziram cerca de 92% do seu rendimento máximo de leite na primeira semana pós-parto, mas seu consumo foi de apenas 80% de seu mais alto CMS. Bauman e Currie (1980) observaram que o BEN está presente até os 100 primeiros dias da lactação. Além disso, Beever et al. (1998) determinaram que o BEN ocorre nas primeiras 20 semanas pós-parto. Já Vries e Veerkamp (2000) observaram que o BEN aconteceu durante os primeiros 41,5 dias em média, assim como os achados de Buttchereit (2011a) onde relata que vacas primíparas apresentaram um BEN durante o primeiro 42 pós parto. Recentemente Von Leesen et al. (2014) observaram que vacas primíparas permaneceram em BEN pelo menos até os 20 dias pós-parto, onde posteriormente houve uma estabilização de energia em torno de 55 pós-parto e aos 63 dias os animais passaram de BEN para balanço energético positivo.

O período anovulatório no pós-parto em vacas leiteiras é variável. Em média, primeira ovulação pós-parto ocorre em 30 dias de lactação (McCOY et al., 2006). Entretanto a prevalência de anovulação pós-parto pode chegar à 60,

40, e 30% aos 21, 49, e 60 dias de lactação, respectivamente (FEIXE e BUTLER, 1997; WALSH et al., 2007; GALVÃO et al., 2010). O aumento da gravidade do balanço energético negativo durante o período pós-parto e um intervalo mais longo de seu *nadir* aumentou o risco e a duração da anovulação pós-parto (BEAM e BUTLER, 1997, 1998).

2.1.14 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE LEITE

O aumento repentino da produção de leite é maior que a do aumento do consumo de alimentos e nutrientes (GRUMMER et al., 1995), o que resulta em períodos de balanço energético negativo no pós-parto (BELL, 1995). Para atender o estado de BEN, ocorrem adaptações no uso e na conservação da energia no organismo da vaca (BAUMAN e CURRIE, 1980), baseadas na obtenção de energia a partir de novos compostos (WITTEWER e GONZALEZ, 2000). Ao mesmo tempo, economia na utilização de glicose por alguns tecidos corporais (HERDT, 2000).

A produção e a composição do leite de vacas mestiças Holandês x Zebu é afetada por diferentes fatores como o nível de manejo da propriedade, o grau de sangue do cruzamento utilizado, o ECC ao parto, o balanço energético em que o animal se encontra e a dieta oferecida ao animal, entre outros (MADALENA et al., 1990; FACÓ et al., 2002).

Em um estudo que avaliou o desempenho de vacas mestiças em um nível baixo ou alto de manejo, Madalena et al. (1990) relataram produção de leite de 2953 kg, em 305 dias, na primeira lactação de vacas F1 submetidas a nível alto de manejo. Por outro lado, a produção foi de 2636 kg de leite, em 375 dias de lactação, nas vacas submetidas a nível baixo de manejo. A produção de sólidos do leite também foi fortemente influenciada pelo nível de manejo. As produções de gordura e proteína foram de 132,4 kg e 99,8 kg nas vacas submetidas a nível alto de manejo e de 113,6 kg e 83,9 kg, respectivamente, naquelas submetidas a nível baixo de manejo.

Muitos estudos relata maior produção leiteira de animais mestiços dos cruzamentos 3/4 HG, 7/8 HG, comparado a animais 1/2 HG e Holandês puro por cruza (> 15/16 H) mantidos em manejo semi intensivo (MADALENA et al., 1983;

FACÓ et al., 2008; BALANCIN JÚNIOR, 2014). Segundo estudo de Jacopini et al. (2016) vacas 3/4., em 7/8 HG o pico de produção (17,13 e 21,39 litros de leite respectivamente) é atingido aos 49,49 e 50,46 dias respectivamente. Canaza-Cayo et al. (2017), analisando 86.863 registros do banco de dados da associação brasileira dos criadores concluíram que vacas 7/8 e 3/4 têm maior performances para a produção de leite em relação aos animais de outros grupos genéticos, diminui essa performance quando se aumenta a proporção do gene Gir.

Guimarães et al. (2002) avaliando eficiências reprodutiva e produtiva em vacas das raças Gir, Holandês e cruzadas Holandês x Zebu, observaram que animais 3/4 e 7/8 Holandês x Zebu apresentaram maior produção de leite em comparação aos da raça Gir. Esse fato, além de associado ao maior grau de sangue da raça holandesa, pode estar ligado à maior adaptabilidade dos animais mestiços ao ambiente, em comparação com os animais puros (Holandês). Facó et al. (2002) e McManus et al. (2008), relataram dados semelhantes; observaram maior produção diária de leite em vacas mestiças com maior grau de sangue Holandês (7/8, 3/4 e 1/2 Holandês x Gir). Segundo os autores, essa maior produção está ligada com a adaptação das vacas mestiças, principalmente as 1/2 e 3/4 Holandês x Gir, ao ambiente que foram submetidas ou que, nas condições que se desenvolveram os estudos, levando em consideração o estresse nutricional e/ou térmico, sendo uns dos motivos que vacas da raça Holandês não expressaram todo o seu potencial genético para a produção de leite.

As vacas de origem zebuína, comumente utilizadas para os cruzamentos com a raça Holandesa, proporcionam aumento nos teores de gordura e proteína à medida que se reduz a fração de genes da raça Holandesa, provavelmente em função da redução na produção de leite. O efeito da heterose para esses cruzamentos foi considerado significativo para o percentual de gordura no leite. Apenas em sistemas de confinamento, em que os parâmetros de sólidos no leite são mais dependentes das características ambientais, observa-se maior produção de sólidos em vacas com maior fração genética da raça Holandesa.

O ECC também interfere na produção de gordura no leite. Segundo Pedron et al. (1993), a maior porcentagem de gordura no leite de vacas com alto ECC ao parto foi atribuída à maior mobilização de gordura corporal na fase inicial da lactação, que proporciona nível elevado de ácidos graxos não esterificados

na circulação. Esses ácidos graxos podem ser utilizados diretamente pela glândula mamária, juntamente com outros nutrientes provenientes da dieta para síntese de gordura do leite (REMPPIS et al., 2011).

O balanço energético da vaca é outro fator muito importante que afeta a composição do leite, e, principalmente, a relação gordura:proteína no leite (GRIEVE et al., 1986; HEUER et al., 2001; FRIGGENS, et al., 2007; BUTTCHEREIT et al., 2010.). A proteína do leite acompanha linearmente a disponibilidade energética da dieta (COULON e RÉMOND, 1991). A porcentagem de gordura no leite sempre é superior à porcentagem de proteína, caracterizando uma relação gordura:proteína no leite superior a 1,0 (um) (FRIGGENS et al., 2007). Paura et al. (2012) afirmaram que a relação gordura:proteína pode ser utilizada para avaliação do BEN e problemas nutricionais em vacas em lactação. Em trabalho realizado por Buttchereit et al. (2010), observou-se que a relação gordura:proteína no início da lactação foi maior em vacas que tiveram BEN mais pronunciado. Buttchereit et al. (2010) demonstraram uma alta relação gordura:proteína no leite, de aproximadamente 1,4, nos primeiros dias de lactação. Esta relação apresenta constante queda até terço médio de lactação (100 dias) quando essa relação chega a 1,05. Dessa forma, apesar das porcentagens de gordura e proteína do leite reduzirem durante o período de balanço energético negativo, a sua relação pode ser utilizada como um indicador do balanço energético do animal (FRIGGENS et al., 2007; BUTTCHEREIT et al., 2010; LOVENDAHL et al., 2010).

Frood e Croxton (1978) já observavam que vacas que pariam com ECC <2,75 produziam leite abaixo do seu potencial, enquanto aquelas vacas que pariam com ECC acima de > 3,25 produziram acima de seu leite potencial para produção de leite. Porém Treacher et al. (1986) relataram que vacas gordas produziram 500 kg de leite a menos durante toda a lactação comparada as vacas magras. Waltner et al. (1993) observaram um aumento de 322 kg no leite durante os 90 primeiros dias de lactação quando o ECC ao parto aumentou 2,0 para 3,0; aumentou 33 kg de leite quando houve um aumento do ECC ao parto de 3,0 para 4,0 e observou que houve um decréscimo na produção de 223 kg de leite quando o ECC ao parto passou de 4,0 para 5,0.

O efeito da nutrição sobre a produção de sólidos do leite tem sido mais extensamente estudado. Fatores como fibra, tamanho da partícula, relação

volumoso:concentrado, nutrientes protegidos no rúmen e o teor de carboidratos não fibrosos da dieta alteram a produção e a porcentagem de sólidos no leite. González et al. (2004) afirmam que o teor da fibra na dieta e a relação entre volumoso e concentrado são os fatores que produzem maior interferência no percentual de gordura no leite. O tamanho e a forma da partícula ingerida afetam o consumo, a taxa de degradação e o tempo de retenção da ingesta no rúmen (VAN SOEST, 1994).

Consumos de energia e proteína são os fatores mais críticos que podem afetar a produção de leite, quando comparado aos demais nutrientes provenientes de diferentes dietas (BRUN-LAFLEUR et al., 2010). Reduzir a concentração de proteína bruta na dieta para vacas em lactação é o modo mais comum e prático para diminuir as perdas de compostos nitrogenados e os custos de produção relacionados à alimentação. Segundo o NRC (2001), a porcentagem de proteína no leite não é afetada significativamente pelo teor de PB da dieta e é fracamente correlacionada com a quantidade de proteína no leite ($r=0,14$). Contudo, se a redução da concentração de PB na dieta for significativamente abaixo das recomendações, ocorre redução na produção de leite. A deficiência de PB na dieta ($< 7\%$) provoca redução do consumo em decorrência ao não atendimento às exigências mínimas dos microrganismos ruminais (VAN SOEST, 1994). Isso ocorre devido ao baixo teor de nitrogênio que limita o crescimento microbiano, provocando redução da digestibilidade da parede celular, do consumo e, conseqüentemente, afetando o desempenho animal (OBEID et al., 2007).

Para que haja alguma alteração da proteína no leite seria necessário maior suprimento de carboidrato não fibroso (CNF), que resultaria em aumento da proteína microbiana produzida, e da quantidade de aminoácidos que chegam à glândula mamária para a síntese de proteína. Um alto consumo de CNF determina maior quantidade de propionato produzido no rúmen, o que pode reduzir o catabolismo de aminoácidos livres para a formação de proteína.

O aumento do teor de gordura no leite e mudanças no perfil proteico podem ser alcançadas com o fornecimento de nutrientes protegidos da degradação ruminal, como no caso de aminoácidos e ácidos graxos (SANCANARI et al., 2001). Essa proteção possibilita o aumento da concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados, permitindo que ácidos graxos

sejam preservados e extraídos pela glândula mamária e incorporados à gordura do leite (BREMNER et al. 1997). Ou seja, existe uma variedade de aspectos nutricionais que podem causar alterações no teor de gordura do leite.

2.1.15 PERFIL METABÓLICO E HORMONAL NO PÓS-PARTO

Durante o período de transição, há alterações no metabolismo das vacas que refletem nas concentrações de alguns metabólitos circulantes no sangue que podem ser mensurados e serem monitorados pelo perfil metabólico (PAYNE et al., 1970; PAYNE e PAYNE, 1987; GONZÁLEZ, 2000; WITTEWER, 2000)

O perfil metabólico, criado por PAYNE et al. (1970) é um conjunto de dosagens sanguíneas que permite quantificar a concentração dos metabólitos provenientes da mobilização de tecidos corporais e com isso realizar o monitoramento do estado fisiológico das vacas principalmente no início da lactação onde às exigências de energia, proteína e minerais são crescentes (WHITAKER et al., 1999). O perfil metabólico permite assim o diagnóstico de transtornos metabólicos, de deficiências nutricionais, como preventivo de desordens latentes, além da pesquisa de problemas de saúde e do desempenho produtivo e reprodutivo de um rebanho (LEBLANC et al., 2006; DUFFIELD et al., 2009).

Segundo Gonzalez e Silva (2006) em ruminantes, a glicose, o colesterol, o ácido graxo não esterificado (AGNE), o beta-hidroxibutirato (BHB) são os representantes do metabolismo energético; proteínas totais, albumina, globulinas e ureia, são os representantes do metabolismo proteico; e cálcio, fósforo inorgânico, magnésio, potássio, ferro, cobre, zinco, selênio e cobalto representantes do metabolismo mineral.

2.1.15.1 Ácidos Graxos não Esterificados (AGNE)

Os AGNE são produto da mobilização da reserva lipídica utilizados para suprir parte da energia deficitária em caso de BEN (BRICKNER et al., 2007). Uma das primeiras respostas do organismo ao BEN é a mobilização do tecido

adiposo e o tecido esquelético é capaz de utilizar AGNE para gerar energia para sua manutenção (OVERTON; WALDRON, 2004). Quando há falta de energia, maior lipólise ocorrerá comparada com a lipogênese, fazendo com que ocorra uma maior taxa de hidrólise de triglicérides de reserva, que por sua vez gera AGNE e o glicerol (LAGO et al., 2004).

As concentrações de AGNE são consideradas a melhor ferramenta para avaliar a intensidade do BEN e altas concentrações indicam excesso de mobilização de reservas corporais e BEN pronunciado (GRUMMER, 1995; DRACKLEY, 1999; OSPINA et al., 2010a). Portanto, a concentração de AGNE é o reflexo da magnitude de mobilização das reservas corporais e começa a aumentar alguns dias antes do parto, tendo como objetivo fornecer energia para suprir as necessidades do organismo (BELL 1995, DUFFIELD e LEBLANC 2009, LEBLANC, 2010).

Leblanc et al. (2005) relataram que há aumento na concentração de AGNE 15 dias antes do parto, normalmente seu pico ocorre no dia do parto e posteriormente há um decréscimo natural, associado ao aumento no consumo alimentar. Ospina et al. (2010b) propuseram alguns valores de referência: no pré-parto, os valores devem ser menores que 0,29 mEq/L e no pós-parto o nível crítico fica em 0,57 mEq/L.

Os AGNE estão relacionados à distúrbios adversos sobre a reprodução. Existem evidências de que o ovário pode acumular seletivamente AGNE de maneira que a concentração encontrada no plasma se correlaciona com os níveis medidos em fluido folicular (COMIN et al. 2002; LEROY et al., 2005; CHILDS et al., 2008; FOULADI-NASHTA et al., 2009). AGNE durante o período de BEN afeta negativamente a proliferação de células da teca, induzindo efeitos inibitórios sobre células da granulosa de bovinos e a produção de progesterona reduzida *in vitro* (VANHOLDER et al., 2006)

Segundo Canfield e Butler, (1990) os AGNE atuam como mensageiros metabólicos no hipotálamo e na hipófise que podem afetar a secreção de gonadotrofinas, sendo assim um dos motivos no retardo da atividade ovariana luteal pós-parto. Leroy et al. (2005) observaram efeito negativo da adição de diferentes ácidos graxos sobre a maturação de oócitos *in vitro* em concentrações semelhantes as observadas no fluido folicular de vacas em BEN, com redução das taxas de clivagem e de produção de blastocistos. Outros estudos *in vitro*,

mostraram que concentrações de AGNE similares aquelas presentes no fluido folicular de vacas em BEN exercem efeito negativo sobre a viabilidade e a função de células da granulosa e da teca (LEROY et al., 2006; VANHOLDER et al., 2006).

2.1.15.2 Glicose

Os bovinos são animais adaptados para a digestão de forragens. Os microrganismos do rúmen são responsáveis pela fermentação dos ácidos graxos voláteis e podem ser oxidado para obtenção de energia. A glicose é um dos principais produtos da digestão de carboidratos no rúmen onde é rapidamente fermentada em ácido graxo volátil. Além de fermentação dos ácidos graxos voláteis, a proteína e a gordura são absorvidas pelo intestino e utilizadas para a síntese da proteína e de gordura do leite.

Segundo Bell et al. (1995), a cada kg de leite produzido pela vaca são necessários 72 g de glicose, onde a sua maioria é convertida em lactose. Entretanto, no início da lactação, a fermentação dos ácidos graxos voláteis só atende cerca de 85% das necessidades de glicose, causando um déficit diário de 500 g de glicose (BELL, 1995). Esse déficit de 15% de glicose no início da lactação faz com que aconteça a mobilização das reservas corporais de proteína, principalmente do músculo esquelético, disponibilizando aminoácidos que serão utilizados na gliconeogênese hepática (BELL, 1995; DRACKLEY, 1999).

A baixa taxa de crescimento embrionário ou fetal em vacas em lactação com baixas concentrações sanguíneas de glicose pode ser um mecanismo importante para explicar a perda da gestação (LUCY et al., 2014). Moore et al. (2014) avaliaram vacas com alta e baixa fertilidade e observaram que aquelas consideradas com alta fertilidade apresentaram maiores concentrações de glicose no dia do parto e uma semana pós-parto. Ainda, Cardoso et al. (2013) observaram que maiores concentrações de glicose no sangue na terceira e quarta semanas pós-parto foram associadas com menor intervalo entre parto e concepção. Green et al. (2012) também observaram que as vacas que conceberam à primeira inseminação pós-parto tiveram maiores concentrações

de glicose durante os primeiros 30 dias pós-parto em comparação com as vacas que não concebeu à primeira inseminação.

Cummins et al. (2012) não observaram diferença na concentração de glicose no pós-parto em vacas de alta e baixa fertilidade, porém as concentrações de insulina e IGF-I foram maiores nas vacas de alta fertilidade. Entretanto, Moore et al. (2014) observaram que a concentração média de glicose foi significativamente maior nas vacas com alta fertilidade em comparação com vacas de baixa fertilidade entre as semanas -2 a 3 em relação ao parto (3,40 vs 3,01 mmol / L). Portanto, existe uma associação positiva entre a concentração circulante de glicose durante o período pós-parto imediato e probabilidade de concepção à primeira inseminação pós-parto (GARVERICK et al., 2013).

Grummer et al. (1994) observaram que quantidades crescentes de propilenoglicol aumentou linearmente às concentrações de glicose e insulina e diminuiu o AGNE no plasma. Butler et al. (2006) avaliaram o efeito da administração de propilenoglicol, um precursor gliconeogênico, sobre o balanço energético, a condição metabólica e o desenvolvimento da primeira onda folicular de vacas em lactação. Estes observaram maiores concentrações plasmáticas de insulina e menores concentrações de AGNE nas vacas que ovularam o primeiro folículo dominante.

2.1.15.3 Insulina

A insulina é um importante hormônio metabólico relacionado com o estado nutricional do animal. Sua liberação é pelo pâncreas durante a absorção de nutrientes da dieta sendo responsável pelas reações anabólicas do organismo. No fígado, a insulina é responsável pela produção de IGF-I, sob estímulo do hormônio do crescimento (GH) (BUTLER et al., 2003). O GH é um hormônio protéico anabolizante secretado pelas células da hipófise anterior, age principalmente na cartilagem epifisária e auxilia no crescimento esquelético e na musculatura, aumentando a massa muscular. O GH age de forma direta ou pode se ligar aos seus receptores (GHR), ou ainda, de forma indireta pelo estímulo da

produção dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) (PARK e VANDERHOOF, 1996).

No início da lactação, a concentração de insulina está baixa, não havendo resposta de recuperação pelo organismo devido à priorização na captação de glicose pela glândula mamária visando a produção de leite (BAUMAN e CURIE, 1980; BELL, 1995). Porém, a redução das concentrações plasmáticas de insulina são observadas ainda no pré-parto e se estendem até as primeiras semanas de lactação (WATHERS et al., 2007) ou quando as vacas passam por restrição alimentar (CARLSON et al., 2006; CHAGAS et al., 2008; FERRARETTO et al., 2014).

Garnsworthy et al. (2009) descreveram a concentração plasmática média entre 0,4 e 0,49 ng/mL dependendo da dieta nos primeiros 120 dias pós-parto. Adiamak et al. (2005) citam concentrações entre 0,42 - 0,86 ng/mL em bovinos com baixo ECC e faixas de 0,70 para 1,88 ng/mL em bovinos com ECC moderados. As concentrações de insulina tendem a ser maiores no período pré-ovulatório (0,3-0,72 ng/mL) em comparação com folículos subordinados (0,12-0,17 ng/mL), mas a concentração basal de insulina circulante é influenciada pela dieta, independentemente do estágio de folículo (LANDAU et al., 2000).

A insulina nas células do ovário tem efeitos mitogênicos, e estimulam a produção de P4 pelas células da granulosa, a produção de estradiol nas células da teca e a produção de P4 pelo corpo lúteo (SPICER e ECHTERNKAMP et al., 1995). Estudos *in vitro* demonstraram que cultura das células da granulosa de bovinos com concentrações fisiológicas de insulina levou a um aumento da produção de estradiol e proliferação celular das células da granulosa (GUTIERREZ et al., 1997; ARMSTRONG et al., 2002). Ainda, o aumento das concentrações de insulina estimula a dinâmica folicular e produção de estrógeno pelas células da granulosa de folículos pequenos em bovinos (ARMSTRONG et al., 2002).

GONG et al. (1993) observaram que a dieta energética aumentou as concentrações circulantes de insulina e aumentou a proporção de vacas que tiveram a primeira ovulação dentro dos primeiros 50 dias pós-parto, reduzindo os intervalos do parto à primeira ovulação. O aumento das concentrações plasmáticas de insulina elevou as concentrações plasmáticas de estrógeno,

produzido pelo folículo dominante da primeira onda folicular, no pós-parto de vacas leiteiras (BUTLER et al., 2004).

Sales et al. (2015), estudando vacas da raça Gir e Holandês não lactantes observaram que, vacas suplementadas com alta energia por mais de 100 dias apresentam maiores concentrações de insulina plasmática comparadas com vacas que receberam dieta de manutenção. Os autores observaram que vacas da raça Gir apresentam maiores concentrações de insulina do que as vacas da raça Holandês ($30,0 \pm 2,5$ vs $10,7 \pm 1,1$ $\mu\text{UI/mL}$ respectivamente).

A IGF-I e insulina associada com os hormônios reprodutivos interagem na atividade ovariana desde a fase inicial de crescimento do folículo (recrutamento), desenvolvimento, bem como no processo de seleção do folículo dominante até o mesmo chegar a ovulação (SARTORI et al., 2016).

2.1.15.4 IGF- I

Estudos demonstraram os efeitos do IGF-I sobre a reprodução (DAFTARY; GORE, 2005; GONG et al., 1997; SCARAMUZZI et al., 1999; KONIGSSON et al., 2008). Assim como outros hormônios metabólicos, o IGF-I apresenta-se desregulado na fase mais crítica da vida de uma vaca leiteira (BELL, 1995).

Existem os IGF-I e -2, porém de acordo com OGILVY-STUART et al. (1998) acredita-se que o IGF-I seja o maior determinante do crescimento e mediador do GH. A ação anabólica do IGF-I é similar à da insulina, consistindo no estímulo celular para a absorção de aminoácidos e glicose (PHILLIPS, 1998). Porém o IGF-I é um sinalizador que avisa a existência de nutriente disponível para a célula, e estimulará a síntese protéica e a proliferação celular (CLEMMONS, 2012). Os IGFs encontram-se ligados a proteínas carreadoras, as IGFBP (GOMES et al., 2009), sendo o GH o responsável pelo aumento das concentrações séricas dessa glicoproteína carreadora (BOISCLAIR et al., 2001). Estas protegem o IGF-I da degradação, aumentando assim o seu tempo de vida e os seus efeitos (COLLETT-SOLBERG e COHEN, 1996; KOISTINEN et al., 1996).

Receptores de GH diminuem no fígado após o parto, reduzindo as concentrações plasmáticas de IGF-I, provocando aumento do GH sérico por retroalimentação negativa (RADCLIFF et al., 2003). Essas altas concentrações de GH e as baixas de IGF-I no sangue favorecem um estado catabólico, fazendo com que a vaca suporte a produção leiteira no pós-parto imediato (LUCY et al., 2001). Entretanto a produção de IGF-I normaliza-se após o período de BEN, diante da elevação da insulina circulante (LUCY, 2000).

As concentrações de IGF-I são crescentes ao longo da foliculogênese em bovinos provavelmente, por este fator de crescimento exercer um papel decisivo na seleção e dominância folicular (GINTHER et al., 2002). Ainda os mesmos autores demonstraram que uma injeção intrafolicular de IGF-I no segundo maior folículo (na divergência) da onda folicular, fez com que este se tornasse o folículo dominante e chegasse à ovulação.

Concentrações elevadas de IGF-I nas duas primeiras semanas após o parto foram encontradas em vacas que tiveram a atividade ovariana no pós-parto retomada, destacando o papel importante de IGF-I de sinal tão sensível entre o metabolismo e reprodução (KONIGSSON et al. 2008).

Segundo Gong et al. (1997), existe correlação entre o IGF-I com o estado metabólico de ruminantes, pois a administração de insulina eleva as concentrações de IGF-I plasmáticos e intrafoliculares em vacas. O IGF-I estimula a produção de GnRH e LH refletindo na ovulação e na esteroidogênese (SCARAMUZZI et al., 1999; DAFTARY e GORE, 2005). Desta forma, o IGF-I juntamente com o estradiol atua modulando a secreção do LH, o qual é essencial no processo de ovulação (XIA et al., 2001). Quando ocorre baixas concentrações de IGF-I e insulina, o folículo não produz estradiol suficiente para provocar o pico de LH e a ovulação (BEAM; BUTLER, 1999), podendo levar o aparecimento de cistos ovarianos (KAWASHIMA et al., 2007). Outra função importante do IGF-I é a proteção das células ovarianas da apoptose (LUCY et al., 2001; WASIELAK e BOGACKI, 2007; HRABIA et al., 2011).

Vacas com deficiência de receptores de GH apresentaram redução nas concentrações plasmáticas de IGF-I, menor número de folículos antrais e parada no desenvolvimento folicular (CHASE et al., 1998). Estudos *in vitro* demonstraram que o IGF-I em combinação com as gonadotrofinas, aumenta as taxas de maturação oocitária, elevando a subsequente competência desses

oócitos ao desenvolvimento embrionário (HARPER e BRACKETT, 1992). Além disso, a adição de IGF-I ao meio de cultivo durante a maturação e fertilização *in vitro* aumentaram a taxa de formação de blastocisto, indicando que esse o IGF-I está envolvido na maturação oocitária em bovinos e ovinos (WALTERS et al., 2006; SHABANKAREH e ZANDI, 2010).

2.1.15.5 Ureia

Uma maneira de aumentar a produtividade de leite é elevar as concentrações de proteína bruta da dieta. A alta ingestão de proteína degradável e o baixo consumo de energia irá resultar em um acúmulo de amônia excessiva no rúmen, que é transformada em uréia no fígado (LEROY et al., 2008a; SINCLAIR et al., 2000), o que pode causar BEN pós-parto, reduzindo assim a fertilidade (LEROY et al., 2008a; BUTLER, 1998). Portanto, concentrações elevadas de proteína na dieta podem causar um baixo desempenho reprodutivo (BUTLER et al., 2003; MELENDEZ et al., 2003; KENNY et al., 2002; MCNALLY et al., 2014).

Altas concentrações de proteína na dieta não tem impacto negativo sobre o reinício da atividade ovariana cíclica em vacas pós-parto. No entanto, vacas com concentrações de nitrogênio de uréia no pasma superior a 20 mg / dL apresentam redução nas taxas de concepção, devido à toxicidade de subprodutos do catabolismo proteico (amônia e ureia) sobre o oócito e o embrião (BUTLER et al., 1996; MELENDEZ et al., 2003; LEROY et al., 2008a). Segundo Butler (2000), valores de ureia plasmática acima de 57 mg/dL são associados à diminuição da fertilidade em vacas leiteiras, por alterar os teores de ureia, Mg, K, P, Zn e pH no útero.

Oócitos recuperados de doadoras com elevadas concentrações de amônia tanto no soro quanto no fluido folicular apresentaram baixa taxa de maturação e baixas taxas de fertilização e de clivagem *in vitro* (LEROY et al., 2008a; HAMMON et al., 2000a), bem como afetou a viabilidade embrionária no útero (RHOADS et al., 2006); no entanto, o efeito dependerá do momento e a duração da exposição (HAMMON et al., 2000b). Segundo Rooke et al., (2004), as células da granulosa expostas a elevadas concentrações de amônia perdem

a capacidade de suportar a maturação oocitária *in vitro*. Em vacas no período de pós-parto precoce existe uma boa correlação entre as concentrações de ureia no plasma e fluido folicular (LEROY et al 2004; LEROY et al 2008a).

2.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, C.L.; FINDLAY, P.A.; MOORE, A.H. Effects of insulin-like growth factor-1 on luteinizing hormone secretion in sheep. *Animal Reproduction Science*, v.50, p. 45-56, 1998.
- ADAMIAK S. J. et al. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 73, p. 918–26, 2005.
- Aguilar-Pérez, C. F.; Ku-Vera, J. C.; Magaña-Monforte, J. G. The use of dietary fats and concentrates to alleviate the negative energy balance in crossbred cows in early lactation. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, v. 17, p. 155 – 159, 2014.
- ALVARENGA, E. A. et al. Avaliação do perfil metabólico de vacas da raça Holandesa durante o período de transição. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, n. 3, p. 281-290, 2015.
- ALVIM, M. J. et al. Estratégia de fornecimento de concentrado para vacas da raça holandesa em pastagens de coast-cross. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, p.1711- 1720, 1999.
- AMSTALDEN, M. et al. Leptin Gene Expression, Circulating Leptin, and Luteinizing Hormone Pulsatility Are Acutely Responsive to Short-Term Fasting in Prepubertal Heifers: Relationships to Circulating Insulin and Insulin-Like Growth Factor I1. *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 127-133, 2000.
- ANDERSEN, K.J. et al. The use of reproductive tract scoring in beef heifers. *Agri-Practice*, v. 12, n. 4, p.19–26, 1991.
- ANKOM Technology. Method 5: acid detergent fiber in feeds filter bag technique. Macedon, 2006.
- ARMSTRONG D. et al. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction*, v. 123 p. 371–378, 2002
- ARMSTRONG, et al. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biology Reproduction*. v. 64, p. 1624-1632, 2001.
- BAGLEY, C.P. Nutritional management of replacement beef heifers: a review. *Journal of animal science*, v. 71, n. 11, p. 3155-3163, 1993.
- BALANCIN JÚNIOR. A. Avaliação de desempenho produtivo e reprodutivo de animais mestiços do cruzamento holandês x gir. *Boletim da Indústria Animal*, v.71, n.4, p.357-364, 2014.
- BANOS, G. et al. Genetic relationship between first-lactation body energy and later-life udderhealth in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 2222–2232, 2006.

BAUMAN, D.E. e CURRIE, B.W. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*. v. 63, p. 1514–1529, 1980.

BEAM, S. W. e BUTLER, W. R. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation post-partum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biology Reproduction*. v. 56, p. 133–142, 1997.

BEAM, S. W. e BUTLER, W.R. Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 121-131, 1998.

BEEVER, D. E. et al. Energy metabolism in high yielding cows. Proc. Br.Soc. Anim. Sci. Annu. Conf., Scarborough, UK. Br. Soc. Anim. Sci., Penicuik, UK, 1998.

BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal Animal Science*, v. 73, p. 2804-2819, 1995.

BERGFELT, D. R., LIGHTFOOT, K. C. e ADAMS, G. P. Ovarian synchronisation following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*, v. 42, n.6, p. 895-907, 1994.

BERRY, D. P., ROCHE, J. R., COFFEY, M. P. Body condition score and fertility – more than just a feeling. *Fertility in Dairy Cows – Bridging the gaps* Liverpool Hope University, Liverpool, UK, p. 107–118, 2007.

BÓ, G. A. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular Waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology*, v. 40, n.2, p. 225-239, 1993.

BÓ, G. A. et al. Local versus systemic effects of exogenous estradiol on ovarian follicular dynamics in heifers with progesterone ear implants. *Animal Reproduction Science* v. 59, p. 141-157, 2000.

BÓ, G. A., CUTAIA L, VENERANDA G. Factibilidad del empleo de la inseminación artificial a tiempo fijo para la producción de carne. *In: Memorias IV Seminario Internacional Reproducción de Grandes Especies. Septiembre* p. 25-27, Bogotá Colombia; 2003.

BOISCLAIR, Y. R. et al. The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system. *The Journal of endocrinology*, v.170, n.1, p.63–70, 2001.

BOLS, P. E. J. et al. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. *Theriogenology*, v. 62, p. 906-914, 2004.

BORGES A.M; MARTINS T.M. Relação entre nutrição e reprodução em rebanhos mestiços leiteiros. In: Simpósio Nacional de Bovinocultura Leiteira, 4, 2013, Viçosa, MG. Anais... Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2013. p.215-236, 2013.

BORGES, Á. M. et al. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, n.5, p. 595-604, 2001.

BORGES, A.M. et al. Reprodução de vacas mestiças: potencialidade e desafios. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.39, n.1, p.155-163, 2015.

BOSSIS, I. et al. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *Journal Animal Science*, v.77, p. 1536-1546, 1999.

BRACKETT, B. G. et al. Normal Development Following In Vitro Fertilization in the Cow. *Biology of Reproduction*, v. 27, p.147-158, 1982.

BREMMER, D.R.; OVRTON, T.R.; CLARK, J.H. Production and composition of milk from jersey cows administered bovine somatotropin and fed ruminally protected amino acids. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 1374-1380, 1997.

BRICKNER, A. E., RASTANI, R. R. e GRUMMER, R. R. Technical note: Effect of sampling protocol on plasma nonesterified fatty acid concentration in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n.5, p. 2219-2222, 2007.

BRITT, J. H. Influence of nutrition and weight loss on reproduction and early embryonic death in cattle. In: World Buiatrics Congress, 17, St. Paul, MN. Proceedings ... St. Paul, MN: WCB, p. 143-149, 1991.

BRITT, J. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. Pages 29–43 in Proc. Annu. Conv. Am. Assoc. Bovine Pract. Am. Assoc. Bovine Pract. Auburn, AL, 1992.

BRUN-LAFLEUR, L. et al. Predicting energyx protein interaction on milk yield and milk composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 9, p. 4128-4143, 2010.

BUNGARTZ, L. et al. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, v. 43, n. 3, p. 667-675, 1995.

BURNS, B. M.; FORDYCE, G.; HOLROYD, R.G. A review of factors that impact on the capacity of beef cattle females to conceive, maintain a pregnancy and wean a calf -Implications for reproductive efficiency in northern Australia. *Animal Reproduction Science*, v.122, p.1-22, 2010.

BUTLER S. T. et al. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *Journal of Endocrinology*, v. 176, p. 205-217, 2003.

BUTLER S.T.; PELTON S.H.; BUTLER WR. Insulin increases 17 β -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction*, v.127, p. 537-545, 2004.

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

BUTLER, S. T.; PELTON, S. H. e BUTLER, W. R. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *Journal of dairy science*, v. 89, p. 2938-2951, 2006.

BUTLER, W. R. Efeito do balanço energético negativo na fertilidade de vacas leiteiras. In: *Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos. Anais...* Uberlândia: 18 a 24 de março de 2004. p. 39-50, 2004.

BUTLER, W. R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 60, p. 449-457, 2000.

BUTLER, W. R. Produção de leite, balanço energético negativo e fertilidade em vacas leiteiras. In: *XII Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos. Anais.*Uberlândia: Conapec Jr., p. 26-36, 2008.

BUTLER, W. R., CALAMAN, J. e BEAM S: W. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy herds. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 858-865, 1996.

BUTLER, W. R., e SMITH, R. D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function. *Journal of Dairy Science*, v. 72, p. 767–783, 1989.

BUTTCHEREIT, N. et al. Evaluation of five lactation curve models fitted for fat:protein ratio of milk and daily energy balance. *Journal of Dairy Science*, v. 93 p. 1702–1712, 2010.

BUTTCHEREIT, N. Model evaluation and estimation of genetic parameters for energy balance and related traits in dairy cows. PhD Thesis. Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany, 2011.

CAMPBELL, B. R., SCARAMUZZI, R. J., WEBB, R. Control of animal follicle development and selection in sheep and cattle. Reproduction in Domestic Ruminants III. *Journal Reproduction Fertility*. v. 49, p. 335 – 350, 1995.

CANAZA-CAYO, A.W. et al. Effect of inclusion or non-inclusion of short lactations and cow and/or dam genetic group on genetic evaluation of Girolando dairy cattle. *Genetics and Molecular Research* 15 (2): gmr.15027768, p. 1-9, 2015.

CANAZA-CAYO, A. W. et al. Genetic parameters of milk production and reproduction traits of Girolando cattle in Brazil. *Italian Journal of Animal Science*, p.1-9, 2017.

CANFIELD, R. W.; SNIFFEN, C. J. e BUTLER, W. R. Effects of excess degradable protein on postpartum reproduction and energy balance in dairy cattle. *Journal of dairy science*, v. 73, n. 9, p. 2342-2349, 1990.

CARDOSO F. C. et al. Prepartum nutritional strategy affects reproductive performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 5859–5871, 2013.

CARDOSO, D.; NOGUEIRA, G.P. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. *Arquivos de Ciências Veterinária e Zoolologia*. Unipar, Umuarama, v. 10, n. 1, p. 59-67, 2007.

CARDOSO, R.C. et al. Accelerated Body Weight Gain During the Juvenile Period as a Model to Assess NPY and Kisspeptin Control of Puberty in Heifers. *Biology of Reproduction*, v. 87, p. 481-481, 2012.

CARLSON, D. B. et al. Metabolic effects of abomasal L-carnitine infusion and feed restriction in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 4819–4834, 2006.

CARVALHO, P. D. et al. Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 6, p. 3666-3683, 2014.

CECCONI, S.; CICARELLI, C.; BARBIERI, M. Granulosa cell-oocyte interactions. *European Journal Obstetrics Gynecology Reproduction Biology*. v. 115, p. 19-22, 2004.

CHAGAS, L. M. Effect of restricted feeding and monopropylene glycol postpartum on metabolic hormones and postpartum anestrus in grazing dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, v. 91, p. 1822–1833, 2008.

CHAGAS, L. M. et al. new perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 4022-4032, 2007.

CHASE, C. C. et al. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. *Journal of Animal Science*, v.76, n.1, p.212–219, 1998.

CHEHAB, F.; LIM, M.E.; RONGHUA, L. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genetics*, v. 12, p. 318 – 320, 1996.

CHILDS S. et al. Effect of dietary enrichment with either n-3 or n-6 fatty acids on systemic metabolite and hormone concentration and ovarian function in heifers. *Animal*, p. 883–893, 2008.

CLEMMONS, D. R. Metabolic actions of insulin-like growth factor-I in normal physiology and diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v.41, n.2, p.425–443, 2012.

COLLARD B. L. et al. Relationships between energy balance and health traits of dairy cattle in early lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 2683–2690, 2000.

COLLETT-SOLBERG, P. F. E COHEN, P. The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v.25, n.3, p.591–614, 1996.

COMIN A, et al. Effect of an acute energy deficit on the hormone profile of dominant follicles in dairy cows. *Theriogenology*, v. 58, p. 899–910, 2002.

COPELIN, J. P. et al. Effect of active immunization of pre-partum and post-partum cows against prostaglandin F-2 α on lifespan and progesterone secretion of short-lived corpora lutea. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 87, n. 1, p. 199-207, 1989.

COULON, J. B. e RÉMOND, B. Réponses de la production et de la composition du lait de vache aux variations d'apports nutritifs. *INRA Productions Animales*, v. 4, n. 1, p. 49-56, 1991.

CROWE, M. A. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, n. s5, p. 20-28, 2008.

CUMMINS, S. B. et al. Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: I. Production characteristics and reproductive efficiency in a pasture-based system. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n. 3, p. 1310-1322, 2012.

CUNNINGHAM, J. G. *Tratado de fisiologia veterinária*. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 387-390, 2004.

DACCARETT, M. G. et al. Performance of Holstein heifers fed 100% or more of National Research Council requirements. *Journal of Dairy Science*, v. 76, n. 2, p. 606-614, 1993.

DAFTARY, S.S. e GORE, A.C. Developmental Changes in Hypothalamic Insulin-Like Growth Factor-1: Relationship to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrinology*, v. 144, p. 2034-2045, 2003.

DAFTARY, S. S. e GORE, A. C. IGF-I in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Experimental Biology and Medicine*, v. 230, n.5, p. 292–306, 2005.

DAVIS RINCKER, L.E.; et al. Effect of intensified feeding of heifer calves on growth, pubertal age, calving age, milk yield, and economics. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 3554–3567, 2011.

DAY M. L. et al. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing secretion. *Biology of Reproduction* v. 37, p. 1054-1065, 1987.

DAY, M. L. et al. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: oestradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. *Biology of Reproduction*, v. 31, p. 332-341, 1984.

DAY, M. L.; ANDERSON, L.H. Current concepts on the control of puberty in cattle. *Journal of Dairy Science*. v. 76, p.1–15, 1998.

DAY, M.L. et al. Effects of Restriction of Dietary Energy Intake during the Prepubertal Period on Secretion of Luteinizing Hormone and Responsiveness of the Pituitary to Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in Heifers. *Journal of Animal Science*. v.62, p.1641-1648, 1986.

de VRIES, M. J. e VEERKAMP, R. F. Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. *Journal Dairy Science*, v. 83, p. 62–69, 2000.

DESJARDINS, C.; HAFS, H.D. Maturation of bovine female genitalia from birth through puberty. *Journal of Dairy Science*, v. 28, p. 502–507, 1969.

DRACKLEY J. K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *Journal of Dairy Science*, v. 82 p. 2259–2273, 1999.

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, v. 35, p. 55-71, 1991.

DUFFIELD T. F. e LEBLANC S. J. Interpretation of serum metabolic parameters around the transition period. Anais 24ª Southwest nutrition and management conference, Tucson, AZ, p.106-114, 2009.

DUFFIELD, T. F. et al. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 2, p. 571-580, 2009.

DUNNE L. D. et al. The effect of pre- and post-insemination plane of nutrition on embryo survival in beef heifers. *Animal Science*, v. 69, p. 411–417, 1999.

EDMONSON A. J. A Body condition scoring chart for holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 72, p. 68-78, 1989.

ERICKSON, G. F. e SHIMASAKI, S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertility and Sterility*, v. 76, n.5, p. 943-949, 2001.

EVANS, A.C.O.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.100, p. 187-194. 1994.

EVANS, N.P. et al. Does estradiol induce the preovulatory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge in the ewe by inducing a progressive change in the mode of operation of the GnRH neurosecretory system? *Endocrinology*, v. 136, p. 5511-5519, 1995.

FACÓ O., et al. Idade ao primeiro parto e intervalo de partos de cinco grupos genéticos Holandês x Gir no Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, p.1920-1926, 2005.

FACÓ, O. et al. Additive and non-additive genetic effects on productive and reproductive traits in Holstein x Gir crossbred cows. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, n. 1, p. 48-53, 2008.

FACÓ, O. et al. Análise do desempenho produtivo de diversos grupos genéticos Holandês x Gir no Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, n. 5, p. 1944-1952, 2002.

FAJERSSON et al. The effects of dietary protein on age and weight at the onset of puberty in Browns Swiss and Zebu heifers in the tropics. *Theriogenology*, v.35, p.845-855, 1991.

FEDER, H.H.; BROWN-GRANT, K. e CORKER C. S. Pre-ovulatory progesterone, the adrenal cortex and the “critical period” for luteinizing hormone release in rats. *Journal of Endocrinology*, v. 50, p. 29-39, 1971.

FERNANDES, S. R. et al. Lipidograma como ferramenta na avaliação do metabolismo energético em ruminantes. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.8, n.1, p.21-32, 2012.

FERRARETTO, L. F. et al. Effect of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 754–763, 2014.

FERREIRA A.M., TEIXEIRA N.M. Estimativas de mudanças na produção de leite com a variação do intervalo de partos em rebanhos bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.24, p.177-181, 2000.

FERREIRA, M. B. D. Descrição de ciclo estral curto no puerpério de multíparas *Bos taurus indicus* da raça Gir leiteiro. *FAZU em Revista*, Uberaba, n. 4, p. 68-72, 2007.

FIGUEIREDO, R. A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v. 47, p. 1489-1505, 1997.

FIGUEIREDO, R. A. et al. Prevalência de duas ondas de crescimento folicular ovariano em vacas da raça Nelore. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 19, p. 200-211, 1995.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos taurus indicus*) cattle. *Theriogenology*, v. 47, p.1489-1505, 1996.

FINDLAY, J. K. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. *Reproduction Fertility Development*, v. 6, p. 127-139, 1994.

FOLDAGER, J., SEJRSEN, K.S. e GRENSEN, J.T. The effect of plane of nutrition on growth and feed utilization in RDM and SDM heifers -revision of energy requirements for growth. *Report from the National Institute of Animal Science*, n. 648. Tjele, Denmark: National Institute of Animal Science, 1988.

FORTUNE, J. E. Follicular dynamics during the bovine estrus cycle: a limiting factor in improvement of fertility? *Animal Reproduction Science*, v. 33, p. 111-125, 1993.

FORTUNE, J. E., RIVERA, G. M., YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 109-126, 2004.

FOSTER, D.L.; JACKSON, L.M. "Puberty in the Sheep," in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, ed. J. Neill. (New York/Oxford, UK: Elsevier/Academic), p. 2127-2176, 2006.

FOSTER, D. L. e NAGATANI, S. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. *Biology of Reproduction*, v. 60, n. 2, p. 205-215, 1999.

FOULADI-NASHTA A. A. et al. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. *Reproduction*, v. 138, p. 771-781, 2009.

FREITAS, A. F. et al. Idade ao primeiro parto, intervalo de partos, produção na primeira lactação e produção por dia de parto de vacas girolando. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49., 2002, Recife. Anais... Recife: UFPE, 2002.

FREITAS, A. F. e MIRANDA, J. E. C. Raças e tipos de cruzamentos para produção de leite. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. (*Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica*, 98), 12 p 2009.

- FRIEDMAN, J.M.; Halaas, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, v. 395, p. 763-770, 1998.
- FRIGGENS N. C. et al. Priming the dairy cow for lactation: A review of dry cow feeding strategies *Animal Research*, v. 53, p. 453–473, 2004.
- FRIGGENS, N. C., RIDDER, C. e LOVENDAHL, P. On the Use of Milk Composition Measures to Predict the Energy Balance of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 5453–5467, 2007.
- FRISCH, R.E. Body fat, puberty and fertility. *Biological Reviews*, v. 59, p.161 – 188, 1984.
- FROOD, M. J. e CROXTON, D. The use of condition-scoring in dairy cows and its relationship with milk yield and live weight. *Animal Production*, v. 27, n. 03, p. 285-291, 1978.
- FUCK, E. J.; MORAES, G. V. e SANTOS, G. T. Fatores nutricionais na reprodução das vacas leiteiras. I. Energia e proteína. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.24, n.3, p.147-161, 2000.
- GALINA C.S; ARTHUR G.H. Review of cattle reproduction in the tropics. Part 1. Puberty and age at first calving. *Animal Breed Abstr*, v.57, p.583-590, 1989.
- GAMBINI, A. L. G. et al. Desenvolvimento folicular e sincronização da ovulação em vacas da raça Gir. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 22, p. 201-210, 1998.
- GARCIA, M.R. et al. Age at puberty, total fat and conjugated linoleic acid content of carcass, and circulating metabolic hormones in beef heifers fed a diet high in linoleic acid beginning at four months of age. *Journal of Animal Science*, v. 81, p. 261-268, 2003.
- GARCIA, M.R. et al. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *Journal of Animal Science*, v. 80, p.2158-2167, 2002.
- GARNSWORTHY P. C. et al. Effect of dietary-induced changes in plasma insulin concentrations during the early postpartum period on pregnancy rate in dairy cows. *Reproduction*, v. 137, p. 759–768, 2009.
- GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. The influence of nutrition on fertility in dairy cows. Pages 39–58 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. P. C. Garnsworthy and J.Wiseman, ed. *Nottingham University Press*, Nottingham, U.K, 1999.
- GARVERICK, H. A. et al. Concentrations of nonesterified fatty acids and glucose in blood of periparturient dairy cows are indicative of pregnancy success at first insemination. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 1, p. 181-188, 2013.
- GASSER, C. L. et al. Induction of precocious puberty in heifers III: Hastened reduction of estradiol negative feedback on secretion of luteinizing hormone. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 2050–2056, 2006b.

GASSER, C. L. et al. Induction of precocious puberty in heifers II: Advanced ovarian follicular development. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 2042-2049 2006c.

GASSER, C. L. et al. Induction of precocious puberty in heifers I: Enhanced secretion of luteinizing hormone. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 2035–2041, 2006d.

GASSER, C. L. Joint Alpharma-Beef Species Symposium: Considerations on puberty in replacement beef heifers. *Journal of animal science*, v. 91, n. 3, p. 1336-1340, 2013.

GASSER, C.L. et al. Effect of timing of feeding a high-concentrate diet on growth and attainment of puberty in early-weaned heifers. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 3118–3122, 2006a.

GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Functional interrelationships between follicles greater than 4mm and follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biological Reproduction*, v. 57, p. 1066-1073, 1997.

GINTHER O. J. et al. Activin A, estradiol, and free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 14-19, 2002.

GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular species. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 239- 257, 2003.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. *Journal Reproduction Fertility*, v. 87, p. 223-230, 1989.

GOFF, J. P. e HORST, R. L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders 1, 2. *Journal of Dairy Science*, v. 80, n. 7, p. 1260-1268, 1997.

GOMES, R. J. et al. Effects of exercise training on hippocampus concentrations of insulin and IGF-I in diabetic rats. *Hippocampus*, v. 19, n.10, p. 981–987, 2009.

GONG J. G. et al. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells in vitro. *Journal Endocrinology*, v. 139, p. 67–75, 1993.

GONG, J. G. et al. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 110, n.1, p. 91–97, 1997.

GONZÁLEZ, F. H. D. e SILVA, S. C. *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. 2. Ed, Editora da UFRGS, Porto Alegre, 2006, 358p

GONZÁLEZ, F. H. D. et al. Perfil metabólico em ruminantes. **Seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: Editora UFRGS**, v. 106, 2000.

GONZÁLEZ, F. H. D. et al. Variações sanguíneas de uréia, creatinina, albumina e fósforo em bovinos de corte no Rio Grande do Sul. *A Hora Veterinária*, v. 20, p. 59-62, 2000.

GONZALEZ, H. L. et al. Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos meses do ano. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, p.1531-1543, 2004.

GONZALEZ-PADILLA, E. et al. Puberty in Beef Heifers. III. Induction of Fertile Estrus. *Journal of Animal Science*, v.40, p.1110-1118, 1975.

GREEN J. C., et al. Pregnancy development from day 28 to 42 of gestation in postpartum Holstein cows that were either milked (lactating) or not milked (not lactating) after calving. *Reproduction*, v. 143, p. 699–711, 2012.

GRIEVE, D. G. et al. Relationship between milk composition and some nutritional parameters in early lactation. *Livest. Production Science*. v. 14, p. 239–254, 1986.

GRIMARD, B. et al. Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and estradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 104, p. 173-179, 1995.

GRUMMER R. R et al. Effect of prepartum and postpartum dietary energy on growth and lactation of primiparous cows. *Journal of Dairy Science*, v. 78, p. 172–180, 1995.

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

GRUMMER, R. R. e RASTANI, R. R. Why reevaluate dry period length? *Journal of Dairy Science*, v.87, p.77-85, 2004.

GRUMMER, R. R. et al. Effect of propylene glycol dosage during feed restriction on metabolites in blood of prepartum Holstein heifers. *Journal of dairy science*, v. 77, n. 12, p. 3618-3623, 1994.

GUILBAULT, L. A. et al. Superovulation by continuous aortic Infusion of follicle stimulating hormone (FSH-P) in cattle. *Theriogenology*, v. 27, p. 233, 1987.

GUIMARÃES, J. D. et al. Eficiência reprodutiva e produtiva em vacas das raças Gir, Holandês e cruzadas Holandês X Zebu. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.31, n.2, p.641-647, 2002

GURETZKY N. A. J. et al. Lipid metabolite profiles and milk production for holstein and jersey cows fed rumen-protected choline during the periparturient period. *Journal of dairy science*, v. 89, p.188-200, 2006.

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

GUTIERREZ C.G. et al. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *Journal of Animal Science*, v. 75, p. 1876-1884, 1997.

GWAZDAUSKAS, F. C., et al. Impact of Follicular Aspiration on Folliculogenesis as influenced by dietary energy and stage of lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 1625–1634, 2000.

HAFEZ E.S.E.; HAFEZ B. *Reprodução Animal*. 7.ed. São Paulo: Editora Manole, 2004. 513p.

HAMMON D. S., WANG S. e HOLYOAK G. R. Ammonia concentration in bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on subsequent embryo development. *Animal Reproduction Science*, v. 58, p. 1-8, 2000a.

HAMMON D. S., WANG S. E HOLYOAK G. R. Effects of ammonia during different stages of culture on development of *in vitro* produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, v.59, p. 23-30, 2000b.

HARPER K. M. e BRACKETT B. G. Enhanced bovine oocyte quality after *in vitro* maturation (IVM) with insulin-like growth factor-I (IGF-I) and gonadotropins. *Biology of Reproduction*, v. 46, p. 67, 1992.

HAYIRLI et al. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 3430–3443, 2002.

HERDT, T H. Variability characteristics and test selection in herdlevel nutritional and metabolic profile testing. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 16, n. 2, p. 387-403, 2000.

HEUER, C, et al. Prediction of Energy Balance in High Yielding Dairy Cows with Test-Day Information, *Journal of Dairy Science* v. 84, p. 471–481, 2001.

HINEY, J. et al. Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. *Endocrinology*, v. 137, p.3717-3728, 1996.

HINEY, J.K.; OJEDA, S.; DEES, W.L. Insulin-like growth factor I: a possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. *Neuroendocrinology*, v. 54, p. 420-423, 1991

HOLM, D.E.; THOMPSON, P.N.; IRONS, P.C., The economic effects of anoestrus synchronization protocol using prostaglandin in beef heifers. *Theriogenology*, v. 70, p. 1507–1515, 2008.

HOLM, D.E.; THOMPSON, P.N.; IRONS, P.C., The value of reproductive tract scoring as a predictor of fertility and production outcomes in beef heifers. *Journal of Animal Science*, v. 87, p.1934–1940, 2009.

HONARAMOOZ, A. et al. Effect of season of birth on the prepubertal pattern of gonadotropin secretion and age at puberty in beef heifers. *Theriogenology*, Philadelphia, v. 52, p. 67-79, 1999.

HONARAMOOZ, A. et al. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. *Animal Reproduction Science*, v. 80, p. 15–29, 2004.

HOPKINS S.M. Reproductive patterns of cattle. In: McDonald LE, Pineda MH. *Veterinary endocrinology and reproduction*. 4 ed. Philadelphia, PA: Lea & Febiger, p. 399-415, 1989.

HRABIA, A. et al. Effect of growth hormone on steroid content, proliferation and apoptosis in the chicken ovary during sexual maturation. *Cell and Tissue Research*, v. 345, n.1, p. 191–202, 2011.

HÜTTMANN, H., E. et al. Analysis of feed intake and energy balance of high yielding first lactating Holsteins with fixed and random regression models. *Animal*, v. 3 p. 181–188, 2009.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* v. 47 p. 23–32, 1997.

INGVARTSEN, K. L. Feeding-and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science and Technology*, v. 126, n. 3, p. 175-213, 2006.

INMET. <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesAutomaticas>. Acessado em 02/02/2015.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Censo Agropecuário 2006: Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. 2. Apuração. Rio de Janeiro: IBGE; 774 p., 2012.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. *Determination of milfat, protein and lactose content* – Guidance on the operation of mid-infrared instruments. Brussels: IDF, 2000. 15p. IDF Standard 141C.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. *Determination of milfat, protein and lactose content* – Guidance on the operation of mid-infrared instruments. Brussels: IDF, 2000. 15p. IDF Standard 141C.

INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY – (IETS), 2013. Embryo Transfer Newsletter. Disponível em: <http://www.iets.org>. Acessado em 21 de Julho de 2014.

IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 34, p. 39-54, 1987.

JACOPINI, L. A. et al. Desempenho produtivo de vacas girolando estimado pelo modelo de wood ajustado por metodologia bayesiana. *Archives of Veterinary Science*, v.2, p. 43-54, 2016.

JONES E.J.; ARMOSTRONG J.D.; HARVEY R.W. Changes in metabolites, metabolic hormones, and Luteinizing hormone before puberty in Angus, Bradford, Charolais, and Siummental heifers. *Journal of Animal Science*, v. 69, p. 1607-1615, 1991.

JUCHEM, S. O. et al. Production and blood parameters of Holstein cows treated prepartum with sodium monensin or propyleneglycol. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.680-689, 2004.

JUCHEM, S. O. et al. Production and blood parameters of Holstein cows treated prepartum with sodium monensin or propylene glycol. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 3, p. 680-689, 2004.

KASTELIC, L. P.; PIERSON R. A.; O. J. Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology*, v. 34, p. 487–498, 1990

KAWASHIMA, C. et al. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction*, v. 133, n.1, p. 155–163, 2007.

KENDRICK K. W. et al. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating holstein cows using transvaginal follicular aspiration *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 1731–1741, 1999.

KENNY D.A., et al. Effect of rumen degradable protein with or without fermentable carbohydrate supplementation on blood metabolites and embryo survival. *Animal Science*, v, 74, p.529-537, 2002.

KHATIB, H. et al. Mutations in the STAT5A gene are associated with embryonic survival and milk composition in cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 2, p. 784-793, 2008.

KINDER, J. E. et al. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 49, p. 393-407, 1995.

KINDER, J.E.; DAY, M.L.; KITTOK, R. J. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 34, p. 167-186, 1987.

KOISTINEN, H. et al. Effect of marathon run on serum IGF-I and IGF-binding protein 1 and 3 levels. *Journal of Applied Physiology*, v. 80, n. 3, p. 760-764, 1996.

KONIGSSON, K. et al. Energy balance, leptin, NEFA and IGF-I plasma concentrations and resumption of post partum ovarian activity in swedish red and white breed cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 50, n. 1, p. 1, 2008.

KOSSAIBATI, M. A. e ESSLEMONT, R. J. The costs of production diseases in dairy herds in England. *The Veterinary Journal*, v. 154, n. 1, p. 41-51, 1997.

KRUIP, T. A. M. et al. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, v. 42, n. 4, p. 675-684, 1994.

KRUIP, T. A. M. et al. Influence of food intake ante partum on the quality of oocytes postpartum in dairy cows. *Reproduction Animal Breed. Adv. Strategy*. p. 327–331, 1996.

LAGO, E. P. et al. Parâmetros metabólicos de vacas leiteiras durante o período de transição pós-parto. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v.11, n.1, p.98-103, 2004.

LAMOND, D. R. "The influence of undernutrition on reproduction in the cow." *Animal Breed. Abstr*, v. 38. 1970.

LANDAU S. et al. Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 64, p.181–97, 2000.

LE FEVER D.G; ODDE K.G. Predicting reproductive performance in beef heifers by reproductive tract evaluation before breeding. *CSU Beef Program Report. Fort Collins*, p. 13-18, 1986.

LEAFLET, A. S. Relationship between body composition and reproduction in heifers. Ames: *Iowa states university*. p. 145-148, 2001.

- LEBLANC S. J., et al. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *Journal of dairy science*, v. 89, p. 1267-1279, 2006.
- LeBLANC S. Overall reproductive performance of Canadian dairy cows: challenges we are facing. *Adv Dairy Technology*, v. 17, p. 137–57, 2005.
- LEBLANC, S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development*, v. 56, suppl. p. s29-s35, 2010.
- LEROY J. L. et al. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction*, v. 130, p. 485–495, 2005.
- LEROY J. L. et al. The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on in vitro bovine embryo quality. *Human Reproduction*, v. 25, p. 768–778, 2010.
- LEROY J. L. M. R. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 80, p. 201–211, 2004.
- LEROY, J. L. M. R. et al. Dietary Fat Supplementation and the Consequences for Oocyte and Embryo Quality: Hype or Significant Benefit for Dairy Cow Reproduction? *Reproduction in Domestic Animals*, v. 49, p. 353–361, 2014.
- LEROY, J. L. M. R. et al. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 623-632, 2008a.
- LEROY, J. L. M. R. et al. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reproduction Domestic Animal*, v. 43, p. 623–632, 2008b.
- LEROY, J. L. M. R. et al. Typical metabolic changes in high producing dairy cows early postpartum and their consequence on oocyte ad embryo quality. *Vlaams Diergeneeskunding Tijdschrift*, v. 75, p. 95-105, 2006.
- LIEN T. F. et al. Effects of propylene glycol on milk production, serum metabolites and reproductive performance during the transition period of dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23, p. 372-378, 2010.
- LOEFFLER, S. H., DE VRIES M. J. e SCHUKKEN Y. H. The effects of timing of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 2589–2604, 1999.
- LOPES, M.A. et al. Controle gerencial e estudo da rentabilidade de sistemas de produção de leite na região de Lavras (MG). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 28, n.4, p. 883-892, 2004.
- LOPES, M.A.; CARDOSO, M.G.; DEMEU, F. A. Influência de diferentes índices zootécnicos na composição e evolução de rebanhos bovinos leiteiros. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 2, p. 446-453, 2009.

LOPEZ-GATIUS, F., YANIZ, J. e MADRILES-HELM, D. Effects of body condition score and score change on the reproductive performance of dairy cows: A meta-analysis. *Theriogenology*, v. 59, p. 801– 812, 2003.

LOVENDAHL P. et al. Limits to prediction of energy balance from milk composition measures at individual cow level. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 1998–2006, 2010.

LUCY M. C., et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal Science* v. 70, p. 3615 –3626, 1992.

LUCY M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 1277–1293, 2001.

LUCY, M. C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 1635-1647, 2000.

LUCY, M. C.; BUTLER, S. T. e GARVERICK, H. A. Endocrine and metabolic mechanisms linking postpartum glucose with early embryonic and foetal development in dairy cows. *Animal*, v. 8, n. s1, p. 82-90, 2014.

MACHATKOVA, M. et al. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology* v. 45 p. 801–810, 1996.

MACIEL, M.N. et al. Leptin Prevents Fasting-Mediated Reductions in Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone and Enhances Its Gonadotropin-Releasing Hormone-Mediated Release in Heifers. *Biology of Reproduction*, v. 70, p. 229-235, 2004.

MADALENA F. E., Estratégias de uso de recursos genéticos visando melhorar a qualidade de leite e derivados. In *SBMA (ed) VII Simpósio de Produção Animal, São Carlos, 2008*.

MADALENA, F. E. et al. Produção de leite e intervalo entre partos de vacas HPB e mestiças HPB: Gir num alto nível de manejo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 18, n. 2, p. 195-200, 1983.

MADALENA, F. E.; et al. Dairy production and reproduction in Holstein-Friesian and Guzera crosses. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 1872- 1886, 1990.

MARTIN, L.C. et al. Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. *Journal of Animal Science*, v. 70, p. 4006-4017, 1992

MCDUGALL S. et al. Patterns of follicular development during periods of anovulation in pasture- fed dairy cows after calving. *Research in Veterinary Science*, v. 58 p. 212-216, 1995.

McDOWALL, S. M. L. et al. A study relating the composition of follicular fluid and blood plasma from individual Holstein dairy cows to the in vitro developmental competence of pooled abattoir-derived oocytes. *Theriogenology*, v. 82, p. 95–103, 2014.

McENTEE, K. Reproductive pathology of domestic mammals. Academic Press, San Diego, CA, 401 pp., 1990.

McMANUS, C. et al. Características produtivas e reprodutivas de vacas Holandesas e mestiças Holandês x Gir no Planalto Central. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, n.5, p.819-823, 2008.

McNALLY, J. C. et al. Effects of physiological and/or disease status on the response of postpartum dairy cows to synchronization of estrus using an intravaginal progesterone device. *Theriogenology*, v. 82, p. 1263–1272, 2014.

MEE, J. F.; SNIJDERS, S. E. M.; DILLON, P. Effect of genetic merit for milk production: Dairy cow breed and pre-calving feeding on reproductive physiology and performance. Fermoy, Irlanda: Teagasc, 2000.

MEIKLE, A. et al. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction*. v. 37, p.127-727, 2004.

MELLENDEZ P. et al. Milk, plasma, and blood urea nitrogen concentrations, dietary protein, and fertility in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 223, p. 628-634, 2003.

MELVIN, E. J. et al. Circulating concentrations of estradiol, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during waves of ovarian follicular development in prepubertal cattle. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 405-412, 1999.

MERTENS, D.R. Análise de fibra e sua utilização na avaliação e formulação de rações. In: *SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA*, 29, 1992, Lavras. Anais... Lavras: SBZ, 1992, p.188

MIHM, M. et al. Follicle wave growth in cattle. *Reproduction Domestic Animal*, v. 37, p. 191-200, 2002.

MONTEIRO, F.M. et al. Reproductive tract development and puberty in two lines of Nellore heifers selected for postweaning weight. *Theriogenology*, v. 80, p. 10–17, 2013.

MONTIEL, F., AHUJA C. Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: a review. *Animal Reproduction Science*, v. 85 p. 1–26, 2005.

MOORE, S. G. et al. Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: IV. Transition period, uterine health, and resumption of cyclicity. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 5, p. 2740-2752, 2014.

MORAN, C.; QUIRKE, J.F.; ROCHE, J.F. Puberty in heifers: a review. *Animal Reproduction Science*, v. 18, p. 167-182, 1989.

MOREIRA, F. et al. Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. *Theriogenology*, v. 53, p. 1305–1319, 2000.

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

MURPHY, L.J.; BELL, G.I.; FRIESEN, H.G. Growth Hormone Stimulates Sequential Induction of c-myc and Insulin-Like Growth Factor I Expression in Vivo. *Endocrinology*, v. 120, p.1806-1812, 1987.

MURPHY, M. G., BOLAND, M. P., ROCHE, J. F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in postpartum beef suckled cows. *Journal Reproduction Fertility*, v. 90, p. 523-533, 1990.

NAKADA, K. et al. Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone. luteinizing hormone. estradiol-17 β . testosterone. progesterone. and inhibin in heifers from birth to puberty. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 18, p. 57-69, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC, 2001. 408p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC, 2001. 408p.

NETT T. M. Function of the hypothalamic-hypophyseal axis during the postpartum period in ewes and cows. *Journal Reproduction Fertility (Suppl.)*, v. 34, p. 201-213, 1987

NILSSON, E.; PARROT, J. A.; SKINNER, M. K. Basic fibroblast factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 175, p. 123-130, 2001.

NOGUEIRA E. et al. Efeito do creep feedig sobre o desempenho de bezerros e a eficiência reprodutiva de primíparas Nelore, em pastejo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, p. 607-613, 2006.

NOGUEIRA, G.;NOGUEIRA, G.P.Puberty in South American *Bos indicus* (Zebu) cattle. *Animal Reproduction Science*, Irlanda, v. 82-83, p. 361-372, 2004.

NOGUEIRA, G.P.et al. Manejo reprodutivo de novilhas em diferentes sistemas de produção. In: Gabriel Ribas Pereira, Tamara Esteves de Oliveira. (Org.). *Anais X Jornada NESPRO*. 1ed.Porto Alegre: UFRGS- NESPRO, v. 1, p. 123-136, 2015.

NOLAN, R. et al. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology*, v. 50, p. 1263-1274, 1998.

NOLLER, C. H.; NASCIMENTO, J. R.; QUEIROZ, D.S. Determinando as exigências nutricionais de animais em pastejo. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGENS, 13, 1996, Piracicaba. Anais ... Piracicaba: FEALQ, 1997. p.319-351.

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

OBA M. et al. Short communication: effects of serum obtained from dairy cows with low or high body condition score on in vitro embryo development. *Journal of dairy science* v. 96, p. 1668–1671, 2013.

- OBEID, J. A. et al. Consumo e digestibilidade total e parcial de componentes nutritivos em bovinos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de proteína bruta. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 4, p. 921-927, 2007.
- OGILVY-STUART, A. L. et al. Insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding protein-1, growth hormone, and feeding in the newborn. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 83, n.10, p. 3550–3557, 1998.
- OJEDA, S. R. et al. Puberty in the rat. In: Knobil. E.; Neill. J. D. The physiology of reproduction. New York: Raven Press, 1878 p., 1994.
- OJEDA, S.; LOMNICZI, A.; SANDAU, U. Glial–gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 20, p. 732-742, 2008.
- OJEDA, S.; SKINNER, M. "Puberty in the rat," in Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, ed. J. Neill. (New York/Oxford, UK: Elsevier/Academic), p. 2061-2126, 2006.
- OJEDA, S.R. et al. The transcriptional control of female puberty. *Brain Research*, v. 1364, p. 164-174, 2010.
- OJEDA, S.R.; TERASAWA, E. "Neuroendocrine regulation of puberty," in Hormones, Brain and Behavior, (New York: Elsevier), v. 89, p. 659, 2002.
- OLIVEIRA, R. S. B. et al. Metabolic profile in crossbred dairy cows with low body condition score in the peripartum period. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 4, p. 362-368, 2014.
- OLSON, B. et al. Effects of insulin-like growth factors I and II and insulin on the immortalized hypothalamic GTI-7 cell line. *Neuroendocrinology*, v. 62, p. 155-165, 1995.
- OSPINA, P. A., et al. Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *Journal of Dairy Science*, v.93, p.3595–3601, 2010a.
- OSPINA, P. A. et al. Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p.1596–1603, 2010b.
- OVERTON T. R.; WALDRON M. R. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 105–119, 2004.
- PARK, J. H. e VANDERHOOF, J. A. Growth hormone did not enhance mucosal hyperplasia after small-bowel resection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 31, n.4, p. 349–354, 1996.
- PATHIRAJA, E. O. Accuracy of rectal palpacion in the diagnosis of corpora lutea in zebu cows *British Veterinary Journal*, v. 142, p. 467-471, 1986.

PAURA, L.; JONKUS, D. e RUSKA, D. Evaluation of the milk fat to protein ratio and fertility traits in Latvian brown nad Holstein dairy cows. *Acta agriculturae Slovenica, Supplement*, v. 3, p. 155-159, 2012.

PAVANI, K. et al. Reproductive Performance of Holstein Dairy Cows Grazing in Dry-summer Subtropical Climatic Conditions: Effect of Heat Stress and Heat Shock on Meiotic Competence and In vitro Fertilization. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 28, n. 3, p. 334, 2015.

PAYNE, J. M. e PAYNE, S. *The metabolic profile test*. Oxford University Press, 1987.

PAYNE, J. M. et al. The use of a metabolic profile test in dairy herds. *Veterinary Record*, v. 87, p. 150-157; 158, 1970.

PEDRON, O. et al. Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 2528–2535, 1993.

PENCE, M.D., BREDAHL, R. Clinical use of reproductive tract scoring topredict pregnancy outcome. In: Proc. 31st Ann. Conf. AABP, Spokane, Washington, pp. 259–260, 1998.

PEREIRA, M. N.; ARMENTANO, L.E. Partial replacement of forage with nonforage fiber sources in lactating cow diets. II. Digestion and rumen function. *Journal of Animal Science*, v. 83, p. 2876-2875, 2000.

PERRY, R. C. et al. Influence of dietary energy on follicular development, serum gonadotropins, and first postpartum ovulation in suckled beef cows. *Journal of Animal Science*, v. 69, p. 3762-73, 1991.

PETER, A. T., VOS, P. L. A. M., AMBROSE, D. J. Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology*, v. 71, p. 1333–1342, 2009.

PHILLIPS, L. S.; PAO, C. I.; VILLAFUERTE, B. C. Molecular regulation of insulin-like growth factor-I and its principal binding protein, IGFBP-3. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, v. 60, p. 195–265, 1998.

PICKETT, M. M.; PIEPENBRINK, M. S. e OVERTON, T. R. Effects of propylene glycol or fat drench on plasma metabolites, liver composition, and production of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science*, v. 86, n. 6, p. 2113-2121, 2003.

PIERSON, R. A., GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*, v. 29, p. 21-37, 1988

PIETERSE, M. C. et al. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, v. 30, n. 4, p. 751-762, 1988.

PINHEIRO, O. L., et al. Estrus behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrusinduced with prostaglandina F₂ α or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, v.49, p.667-681, 1998.

POGLIANI, F. C. et al. Influência da gestação e do puerpério no lipidograma de bovinos da raça Holandesa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, n.2, p.273-280, 2010.

PONTES J. H. F., et al. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, v. 74, p. 1349–1355, 2010.

RADCLIFF R.P. et al. Effect of dietary energy and somatotropin on components of the somatotropic axis in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 1229 – 1235, 2004.

RADCLIFF R.P. et al. Effects of diet and bovine somatotropin on heifer growth and mammary development. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 1996 – 2003, 1997.

RADCLIFF, R. P. et al. Plasma hormones and expression of growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 86, n.12, p. 3920–3926, 2003.

RAETH-KNIGHT, M., H. et al. Impact of conventional or intensive milk replacer programs on Holstein heifer performance through six months of age and during first lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 799–809, 2009.

REINHARDT, R.R.; Bondy, C. Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. *Endocrinology*, v. 135, p. 1753-1761, 1994.

REIS, R. A. et al. Suplementação da dieta de bovinos de corte como estratégia do manejo das pastagens. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, p. 147-159, 2009.

REMPPIIS, S. et al. Effects of energy intake on performance, mobilization and retention of body tissue, and metabolic parameters in dairy cows with special regard to effects of pre-partum nutrition on lactation-A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 24, n. 4, p. 540-572, 2011.

RHOADS, M. L. et al. Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 91, n. 1, p. 1-10, 2006.

RIVERA, G. M. et al. Ovarian follicular wave synchronization and induction in postpartum beef cows. *Theriogenology*, v. 49, p. 1365- 75, 1998.

RIZOS, D., et al. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. *Theriogenology* v. 63 p. 939–949, 2005.

ROBINSON, J. J. Nutrition in the reproduction of farm animals. *Nutrition Research Reviews*, v. 70, n.12, p. 253-276, 1990.

ROCHE, J. F.; MACKEY, D.; DISKIN, M. D. Reproductive management of postpartum cows. *Animal Reproduction Science*, v. 60, p. 703-712, 2000.

ROCHE, J. R. et al. Invited review: body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*, v.92, p. 5769–5801, 2009.

RODRIGUES, H.D.; KINDER, J.E.; FITZPATRIK, L.A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at differing ages. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 603 -609, 2002.

RODRIGUEZ, R.E.; WISE, M.E. Ontogeny of pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the bull calf during infantile and pubertal development. *Endocrinology*, v.124, p.248-256, 1989.

ROOKE, J. A. et al. Dietary carbohydrates and amino acids influence oocyte quality in dairy heifers. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 21, p. 419–427, 2009.

ROOKE, J. A. et al. Effect of ammonium chloride on the growth and metabolism of bovine ovarian granulosa cells and the development of ovine oocytes matured in the presence of bovine granulosa cells previously exposed to ammonium chloride. *Animal Reproduction Science*, v. 84, n. 1, p. 53-71, 2004.

ROSENKRANS, K.S.; HARDIN, D,K. Repeatability and accuracy of reproductive tract scoring to determine pubertal status in beef heifers. *Theriogenology*. V. 59, p. 1087-1092, 2003.

RUAS J.R.M. et al. Efeito do peso à cobertura sobre a produção e reprodução de vacas primíparas holandês x zebu. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004, Campo Grande. Anais... Campo Grande, MS: SBZ, p. 1-5, 2004.

RUAS J.R.M. et al. Vacas F1 Holandês x Zebu: uma opção para sistema de produção de leite em condições tropicais. *Informe Agropecuário*, v.35, p.113-120, 2014.

RUAS, J. R. M. et al. Concentrações plasmáticas de colesterol, glicose e uréia em vacas zebuínas em relação à condição corporal e ao status reprodutivo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, (supl. 1), p. 2036-2042, 2000.

SÁ FILHO, M.F. et al. Biotecnologia da reprodução em bovinos. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 3. Londrina, 2008. Anais...p. 54-67.

SALES, J. N. S. et al. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Journal of dairy science*, v. 98, n. 5, p. 3086-3099, 2015.

SALIBA, E. O. S. et al. Use of Infrared Spectroscopy to Estimate Fecal Output with Marker Lipe. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v.4, p.1-10, 2015.

SANCANARI, J. B. D. et al. Efeito da metionina protegida e não protegida da degradação ruminal sobre a produção e composição do leite de vacas Holandesas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, p. 286-294, 2001.

SANTOS M. R. Efeito da quantidade de concentrado da dieta de vacas holandesas não-lactantes na progesterona plasmática, composição do fluido folicular e produção de prostaglandina pelo endométrio. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2005.

SANTOS, A. D. F. et al. Utilização de óleo de soja em rações para vacas leiteiras no período de transição: consumo, produção e composição do leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, n. 7, p. 1363-1371, 2009a.

SANTOS, G. T.; DAMACENO, J. C. Nutrição e alimentação de bezerras e novilhas. In: NUTRIÇÃO DE GADO DE LEITE, 1999, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: EV-UFMG, 1999. p. 39-64. Escola de Veterinária da UFMG, v. 1, p. 39-64, 1999.

SANTOS, J. E. P., RUTIGLIANO, H. M. e FILHO, M. F. S. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 110, p. 207–221, 2009.

SANTOS, J.E.P; SÁ FILHO, M.F. Nutrição e reprodução em bovinos. Biotecnologias da Reprodução em Bovinos. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2. Londrina, 2006. Anais...p. 30-54.

SARTORELLI, E.S. et al. Morphological haracterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, v. 63, p. 2382-94, 2005.

SARTORI R. et al. Metabolic hormones and reproductive function in cattle. *Animal Reproduction*, v. 10, n.3, p.199-205, 2013.

SARTORI, R. et al. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology*, v. 86, n. 1, p. 32-40, 2016.

SATURNINO, H. M.; AMARAL, T. B. Perspectivas para uso eficiente da interação nutrição-reprodução em fêmeas bovinas de corte. In: *REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA*, 41, Campo Grande - MS. Anais...Campo Grande: SBZ, 2004.

SCARAMUZZI, R. J. et al. The effects of exogenous growth hormone on follicular steroid secretion and ovulation rate in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 17, n.2-3, p. 269–277, 1999.

SCHAMS, D. et al. Endocrine patterns associated with puberty in male and female cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 30, p. 103-110, 1981.

SCHILLO, K. K.; HALL, J. B.; HILEMAN, S.M. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *Journal of Animal Science*, v. 70, p. 3994-4005, 1992.

SEJRSEN K.; PURUP S. Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy heifers: a review. *Journal of Animal Science*, v.75, p. 828-835, 1997.

SEMMELMANN, C.E.N.; LOBATO, J.F.; ROCHA, M.G. Efeito de sistemas de alimentação no ganho de peso e desempenho reprodutivo de novilhas Nelore acasaladas aos 17/18 meses. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, n. 3, p. 835-843, 2001.

SHABANKAREH H. K. e ZANDI M. Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine. *Fertility and Sterility*, v. 94, p. 335-340, 2010.

SHAMAY, A., D. Werner, U. Moallem, H. Barash, and I. Bruckental. 2005. Effect of nursing management and skeletal size at weaning on puberty, skeletal growth rate, and milk production during first lactation of dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 1460–1469, 2005.

SHORT, R. E. et al. Breeding heifers at one year of age: biological and economic considerations. FIELDS, MJ; SANDS, RS Factors affecting calf crop. Boca Raton: CRC, p. 55-68, 1994.

SHUPNIK M. A. Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin - releasing hormone. *Biology of Reproduction*, v. 54, p. 279-286, 1996.

SILVA J.M.; PRICE C.A. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *Journal Endocrinology*, v. 174, p. 499-508, 2002.

SILVA, L.F.P. Interface da nutrição com a reprodução: o que fazer? In: *Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 16. 2005, Goiânia. *Anais...* Goiânia: CBRA, CD-ROM.

SILVA, J. S. e QUEIROZ, A. C. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 3.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235p

SIMPSON, R.B. et al. Effect of active immunization against growth hormone-releasing factor on growth and onset of puberty in beef heifers. *Journal of Animal Science* v. 69, p. 4914-4924, 1991.

SINCLAIR K. D., SINCLAIR L. A. e ROBINSON J. J. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: I. Adaptive changes intake and metabolism to diets differing in their rate of energy and nitrogen release in the rumen. *Journal Animal Science*, v.78,p.2659-2669, 2000.

SIRARD, M. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* v. 65 p. 126–136, 2006.

SKLAN, D. et al. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids and cottonseeds fed to high yielding cows. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n.70, p. 2463-2472, 1992.

SOCHA, M. T. et al. Dietary recommendations for replacement heifers. *Krafftutter*, n. 4, p. 156-160, 2000.

SOUZA, A. H. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v. 70, p. 208–215, 2008.

SOUZA, E. M. et al. Influências genéticas e de meio ambiente sobre a idade ao primeiro parto em rebanhos de Gir leiteiro. *Revista Sociedade Brasileira Zootecnia*, v. 24, p. 926-935, 1995.

SPICER L. J. e ECHTERNKAMP S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 12, p. 223–45, 1995.

SPICER, L. J. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 21, p. 251-270, 2001.

SPICER, L. J.; TUCKER, W. B.; ADAMS, G. B. Insulin-like growth factor-1 in dairy cows relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrus behavior. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 929-937, 1990.

SULLIVAN, K.; FELDMAN, E. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 during development in the rat brain. *Endocrinology*, v. 135, p. 540-547, 1994.

TEODORO, R. L., et al. Cruzamento *tricross* em gado de leite. Informe Agropecuário, v.22, n. 211, p. 7-10, 2001.

TREACHER, R. J.; REID, I. M. e ROBERTS, C. J. Effect of body condition at calving on the health and performance of dairy cows. *Animal Production*, v. 43, n. 01, p. 1-6, 1986.

VAICIUNAS, A. et al. Leptin and hypothalamic gene expression in early- and late-maturing *Bos indicus* Nellore heifers. *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, n.3, p. 657-664, 2008.

VAN HOECK V, et al. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. *PloS one*, v. 6, n. 8, p. e23183, 2011.

VAN SOEST, P. J. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2nd.ed. Ithaca, NY:Comstock Publishing Associates, 1994. 476p.

VANHOLDER T.; OPSOMER G. e de KRUIF A. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reproduction Nutrition Developmen*, v. 46, 105–119, 2006.

VASQUEZ, E. F. A. *Suplementação com carboidratos não estruturais para novilhas mestiças Holandês x Zebu em pastagem de Panicum maximum cv. Mombaça*. 2002, 113F. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VELDHUIS, J.D. et al. Somatotropic and gonadotropic axes linkages in infancy, childhood, and the puberty-adult transition. *Endocrine Reviews*, v. 27, p. 101-140, 2006.

VÉSPER A.H; RAETZMAN L.T.; CAMPER S.A. Role of prophet of Pit1 (PROP1) in gonadotrope differentiation and puberty. *Endocrinology*, v. 147, n. 4, p. 1654-1663, 2006.

VIANA, J. H. M. e BOLS, P. E. J. Biologic variables associated with cumulus oocyte complex recovery using follicular aspiration. *Acta Scientiae Veterinariae* (UFRGS. Impresso). v. 33, n.1, p. 1-4, 2005.

VIANA, J. H. M., et al. Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n.12, p. 2501-2509, 2000.

VIANA, J. H., et al. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 84, p. 1-12, 2004.

VIANA, J. H., et al. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*, v. 73 p. 966-72, 2010.

VILELA, D. A importância econômica, social e nutricional do leite. *Revista Batavo*, nº 111, 2001.

von LEESEN, R. et al. Effect of genetic merit for energy balance on luteal activity and subsequent reproductive performance in primiparous Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 1128–1138 2014.

WALSH S. W., WILLIAMS E. J., EVANS A. C. O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 123 p. 127–138, 2011.

WALTERS K. A. et al. The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. *Reproduction*, v. 131 p. 515-523, 2006.

WALTNER, S. S.; MCNAMARA, J. P. e HILLERS, J. K. Relationships of body condition score to production variables in high producing Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 76, n. 11, p. 3410-3419, 1993.

WASIELAK, M. e BOGACKI, M. Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-I during in vitro maturation of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, v. 53, n. 2, p. 419-426, 2007.

WATHES D. C.; ABAYASEKARA D. R. E. e AITKEN R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biology of Reproduction*, v. 77, p. 190–201, 2007.

WATHES, D. C. et al. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology*, v. 68, p. 232–241, 2007.

WATTIAUX, M. A., and D. McCullough. Factors affecting size and productivity of the dairy replacement herd. In: Dairy Essentials No. 26 Babcock Institute for International Dairy Research and Development. University of Wisconsin, Madison, US. p: 101–104, 2000.

WEBB, R et al. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Journal of reproduction and fertility*. v. 54, p. 33-48, 1999.

WEBB, R. et al. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*, v. 82, p. 63–74, 2004.

WEBB, R. et al. Mechanism regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction in Domestic Ruminants V. Reproduction Supplement* v. 61, p. 71–90, 2003.

WEBB, R. et al. Regulação intra-ovariana do desenvolvimento foliular e competência dos oócitos em animais de produção. In: *Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos. Anais...*Uberlândia: Conapec Jr., p. 66-75, 2008.

WILLIAMS, G. L. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. *Journal of Dairy Science*, v. 68. p. 831 – 852, 1990.

WILTBANK MC, GUMEN A, SARTORI R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*, v. 57, p. 21-52, 2002.

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

WITTWER, F. e GONZALEZ, F. H. D. Marcadores bioquímicos no controle de problemas metabólicos nutricionais em gado de leite. *Perfil metabólico em ruminantes. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, p. 53-63, 2000.

WITTWER, F. G. et al. Bulk milk urea concentrations and their relationship with cow fertility in grazing dairy herds in Southern Chile. *Preventive veterinary medicine*, v. 38, n. 2, p. 159-166, 1999.

WONNACOTT K. E, et al. 2010: Dietary omega-3 and-6 polyunsaturated fatty acids affect the composition and development of sheep granulosa cells, oocytes and embryos. *Reproduction*, v. 139, p. 57–69, 2010.

XIA Y. X. et al. Interactions of insulin- like growth factor-I, insulin and estradiol with GnRH-stimulated luteinizing hormone release from female rat gonadotrophs. *European Journal Endocrinology*, v. 144, p. 73-79, 2001.

YAAKUB, H., O'CALLAGHAN, D., BOLAND, M. P. Effect of roughage type and concentrate supplementation on follicle numbers and *in vitro* fertilization and development of oocytes recovered from beef heifers. *Animal Reproduction*

YAVAS Y., WALTON J. S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: A review. *Theriogenology*, v. 54 p. 1-23, 2000.

YELICH J.V. et al. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-1, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Domestic Animal Endocrinology*, v.13, p. 325 – 338, 1996.

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar a puberdade de novilhas leiteiras e os diferentes parâmetros produtivos e reprodutivos de vacas primíparas mestiças leiteiras no pós-parto imediato.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar parâmetros reprodutivos de novilhas mestiças Holandês x Gir aleitadas com quatro diferentes dietas com diferentes níveis de matéria seca;
- Avaliar diferentes parâmetros produtivos e de consumo, bem como determinar o balanço energético de vacas primíparas mestiças Holandês x Gir (3/4 e 7/8) no pós-parto submetidas a dois níveis de energia na dieta;
- Avaliar o efeito de níveis alto e baixo de energia na dieta de novilhas mestiças (3/4 and 7/8 HG) sobre o perfil metabólico e hormonal, bem como sobre a produção de oócitos e embriões durante a fase inicial do pós-parto.

4 HIPÓTESES

- Novilhas aleitadas com maior teor de matéria seca na dieta anteciparão a ciclicidade em consequência sua puberdade, entrando mais cedo em vida produtiva;
- Vacas primíparas alimentadas com maior teor de energia na dieta terão melhor consumo de matéria seca, melhores índices de produtividades de leite e seus componentes, ainda reduzirão o balanço energético negativo bem como seus efeitos negativos;

- Vacas primíparas alimentadas com maior teor de energia na dieta apresentarão melhor perfil metabólico e hormonal, assim como melhores taxas de oócitos viáveis e embriões;

**Artigo a ser submetido no periódico: Arquivo Brasileiro de Medicina
Veterinária e Zootecnia**

Qualis: A2 – Medicina Veterinária

**Efeito de dietas pré-desmama sobre o desenvolvimento do trato reprodutivo e taxa
de concepção de novilhas**
*Effect of pre-weaning diets on reproductive tract development and conception rates in
heifers*

Gustavo Bervian dos Santos^{(1)*}; Bruno Campos de Carvalho⁽²⁾ Felipe Zandonadi
Brandão⁽¹⁾; Lilian dos Santos Ribeiro⁽¹⁾; Camila Flávia de Assis Lage⁽³⁾; Sandra Gesteira
Coelho⁽³⁾; Bruna Rios Coelho Alves⁽²⁾⁽⁴⁾

⁽¹⁾Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro,
24230-340, Brasil

⁽²⁾Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36038-330, Brasil

⁽³⁾Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 30161-
970, Brasil

⁽⁴⁾University of Nevada, , Reno, 89557, Estados Unidos

*Autor para correspondência: gberviansantos@hotmail.com

Resumo: O objetivo do estudo foi avaliar parâmetros reprodutivos de novilhas aleitadas com quatro diferentes dietas na fase pré-desmama. Bezerras do cruzamento Holandês x Gir (n=60) foram distribuídas em quatro tratamentos experimentais considerando o nível de matéria seca no leite (T1 = 13,5%, T2 = 16,1%, T3 = 18,2% e T4 = 20,4%) na fase de aleitamento. A puberdade foi determinada através de análise semanal das concentrações circulantes de progesterona. A idade média na puberdade foi semelhante entre os tratamentos (305,7 ± 4,73 dias), assim como o peso na puberdade (285,8 ± 3,41 Kg). Todas as novilhas deste estudo foram púberes antes de atingirem 350 kg de peso vivo. Quando as novilhas atingiram 250 kg de peso vivo, foram iniciadas avaliações quinzenais do trato reprodutivo, realizadas por palpação transretal e ultrassonografia. Os seguintes parâmetros foram avaliados: tônus uterino, diâmetro dos cornos uterinos, tamanho dos ovários, diâmetro do maior folículo ovariano, ocorrências de ciclos estrais curtos e taxa

de concepção. Não se observou efeito ($P>0,05$) da dieta de aleitamento oferecida com quatro diferentes teores de matéria seca no leite integral no escore do tônus uterino ($4,4 \pm 0,38$), diâmetro uterino ($13,43 \pm 0,66$ mm) e diâmetro do ovário ($20,16 \pm 1,37$ mm), no entanto, a ocorrência de ciclos curtos foi observada em menor frequência em novilhas do T4 em relação ao T1 e T3. O aumento de sólidos totais no leite integral pela adição de sucedâneo de leite até 20,4% durante o período pré-desmame foi relacionado a maior diâmetro do folículo ovariano observado em dia aleatório da onda folicular e a promoveu maior fertilidade após a primeira inseminação artificial.

Palavras-chave: puberdade, concepção, nutrição, bovino

Abstract: The objective of the study was to evaluate reproductive parameters of heifers fed with four different diets in the pre-weaning stage. The objective of the study was to evaluate reproductive parameters of heifers fed with four different diets in the pre-weaning stage. Crossbred Holstein x Gyr cows ($n = 60$) were distributed in four experimental treatments consisting of increasing levels of dry matter containing in their liquid feed (T1 = 13.5%, T2 = 16.1%, T3 = 18.2% and T4 = 20.4%). Puberty was determined by weekly analysis of circulating concentrations of progesterone. The average age at puberty was similar between treatments (305.7 ± 4.73 days), and so was the weight at puberty (285.8 ± 3.41 Kg). All heifers of this study were pubertal before reaching 350 Kg body weight. When heifers reached 250 kg BW they were introduced to biweekly reproductive tract evaluation, performed via transrectal palpation and ultrasonography. The following parameters were evaluated: uterine tonus, uterine horn thickness, ovarian size, diameter of the largest ovarian follicle, occurrences of short estrous cycles, and conception rate. There was no effect ($P> 0.05$) of the diet offered with four different contents of dry matter in the whole milk in uterine tonus (4.4 ± 0.38), uterine horn thickness (13.43 ± 0.66 mm) and ovary size (20.16 ± 1.37 mm), but short estrous cycles were less frequently observed on T4, in comparison with T1 and T3 The increase of total solids in whole milk by the addition of milk replacer up to 20.4% during the pre-weaning period was related to a larger size attained by the largest ovarian follicle in a random day of the follicular wave, and promoted higher fertility after the first artificial insemination.

Keywords: puberty, conception, nutrition, bovine

Introdução

O aumento da ingestão de nutrientes líquidos durante o período pré-desmame ou de amamentação demonstrou melhorar o desempenho (Shamay et al. 2005, Rincker et al. 2011, Azevedo et al. 2016) e saúde (Ollivett et al. 2012) de bezerras. A ingestão *ad libitum* de leite integral ou sucedâneo do leite durante os primeiros 40-60 dias de vida, em oposição à ingestão restrita, promove um crescimento acelerado (Jasper e Weary 2002, Schäff et al. 2016, Shamay et al. 2005) e aumenta o metabolismo anabólico (Schäff et al. 2016).

O aumento da produção de leite na primeira lactação em vacas pode ter um efeito duradouro, sendo este promovido por um plano nutricional intenso acompanhado por um maior ganho de peso médio diário durante o início da vida (Soberon et al. 2012, Shamay et al. 2005). Regimes de alimentação pré-desmama em bezerras também parecem programar o desempenho reprodutivo na vida adulta do animal. Fato este justificado pelos resultados de estudos aonde observaram associações entre alimentação intensa durante o período de amamentação com idade mais precoce na puberdade (Rincker et al. 2011, Shamay et al. 2005) ou no primeiro parto (Raeth-Knight et al. 2009, Bar- Peled et al., 1997). Por outro lado, outros autores não observaram efeito do aumento da ingestão de nutrientes durante a infância sobre a puberdade (Lage et al. 2017), primeiro estro (Bar-Peled et al. 1997), primeira gestação (Terré, Tejero e Bach 2009) ou primeiro parto (Kiezebrink et al. 2015, Rincker et al. 2011, Shamay et al. 2005) e nas taxas de concepção (Rincker et al. 2011, Bar- Peled et al. 1997, Terré et al. 2009). Esse dado controverso é provavelmente resultado de uma série de fatores que afetam o desenvolvimento puberal e a fertilidade, e indica o quão desafiador pode ser determinar como a nutrição no início da vida poderia afetar o desempenho reprodutivo na vida adulta do animal.

A otimização do desempenho reprodutivo em novilhas é desejável, não apenas devido ao fato que a fertilidade e a idade ao primeiro parto são fatores determinantes para a vida produtiva da fêmea, mas também porque falhas na reprodução implicam em perdas econômicas importantes, especialmente quando a inseminação artificial é adotada. Em novilhas, a capacidade de conceber e levar uma gestação a termo depende da ocorrência da ovulação, seguida de uma fase lútea de duração normal (Kinder et al., 1987; Moran et al., 1989).

Os esteróides ovarianos são importantes estimuladores do desenvolvimento do trato reprodutivo feminino, o que ocorre marcadamente durante os 50 dias anteriores à primeira ovulação (Day et al., 1987). A fertilidade completa de uma novilha é geralmente obtida após a terceira ovulação (Byerley et al., 1987), e acredita-se que ela resulte da

maturação uterina pós-puberal, que ocorre após estimulação sequencial por estradiol e progesterona. O desenvolvimento do trato reprodutivo peripuberal é caracterizado pelo aumento da genitália tubular e dos ovários, aumento do tamanho máximo atingido pelos folículos dominantes e aumento do tônus uterino e esses parâmetros têm sido utilizados para determinar a maturidade reprodutiva e orientar a decisão sobre o momento de gestar uma novilha. A relação entre o desenvolvimento do trato reprodutivo e a nutrição precoce em bovinos ainda não foi estabelecida.

O presente artigo trata-se da continuação de um estudo conduzido com bezerras mestiças alimentadas com quantidades crescentes de substituto de leite em pó adicionado ao leite integral durante o período de amamentação. Dados relacionados ao crescimento e desempenho, eficiência alimentar, metabolismo da glicose, idade a puberdade, quantidade de gordura na glândula mamária durante os períodos pré e pós-desmame foram publicados anteriormente (Azevedo et al. 2016, Furini et al. 2018, Lage et al. 2017). Sendo assim, o objetivo do presente artigo foi avaliar se o aumento da ingestão de nutrientes no início da vida da fêmea no desenvolvimento do trato reprodutivo e assim determinaria em uma maior fertilidade quando da realização da primeira inseminação artificial.

Material e métodos

O experimento foi realizado nas instalações da Fazenda Experimental da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, Brasil. Todos os procedimentos relacionados a animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso para Animais da Embrapa (CEUA), protocolos números 06/2014 e 21/2014.

Cinquenta e oito novilhas mestiças Holandês x Gir (até 3/8 Gir) foram inicialmente utilizadas no estudo. As novilhas receberam 3 Litros de colostro no primeiro dia de vida e entre os dias 2 a 5 de vida receberam 6 Litros por dia de leite bovino integral (12,6% MS, 25,6% PB). No quinto dia de vida, as fêmeas foram divididas em quatro tratamentos experimentais, sendo estes constituídos por diferentes níveis crescentes de matéria seca no aleitamento. O ajuste da matéria seca foi realizado adicionando-se sucedâneo de leite (Sprayfo Violet SSP, Sloten BV, Deventer, Holanda; 89,3% MS, 21,2% PB) ao leite integral sendo que o teor real de matéria seca dos tratamentos foram os seguintes: T1 = 13,5%, T2 = 16,1%, T3 = 18,2% e T4 = 20,4%.

As novilhas foram alocadas individualmente e recebiam 6 Litros de leite por dia, em duas refeições, sendo esta dieta mantida até quando completaram 55 dias de vida.

Posteriormente, até completarem 60 dias de vida e serem desmamadas, passaram a receber 3 litros de leite por dia. Um concentrado inicial (Soylac Rumen 20% Flocculated, Total Alimentos, Três Corações, Brasil) foi oferecido *ad libitum* desde o dia 2 de vida até completarem 90 dias de idade a todos os animais. Silagem de milho foi oferecida *ad libitum* a partir dos 70 dias de vida até o final do experimento. A partir dos 90 dias, as novilhas foram realocadas em piquetes coletivos (14-15 animais/piquete), onde era ofertado silagem de milho e 2 kg de concentrado (21% PB) por animal por dia. Esta dieta foi mantida até o final do experimento. Água era oferecida *ad libitum* durante todo o período do estudo.

O desempenho ponderal das novilhas foi caracterizado pelo aumento linear do peso corporal, medidas biométricas e ganho médio diário relacionado ao aumento das concentrações de sólidos totais da dieta líquida até o dia 60 de vida (Azevedo et al. 2016); entretanto, em estágios posteriores da fase de criação (120 dias até a puberdade), o peso corporal e as medidas, assim como o desempenho nutricional, foram semelhantes entre os tratamentos, com exceção da altura de garupa (diferente até os 120 dias) e circunferência torácica (diferente até os 180 dias - Lage et al., 2017). Detalhes relacionados ao manejo nutricional, bem como a composição de nutrientes e a ingestão de leite integral, sucedâneo do leite, silagem de milho e concentrado e desenvolvimento ponderal foram publicados anteriormente (Lage et al. 2017, Azevedo et al. 2016).

A avaliação do peso corporal foi realizada semanalmente até a detecção da puberdade. A avaliação da puberdade (ocorrida em média aos $305,7 \pm 4,7$ dias de idade e aos $285,8 \pm 3,4$ kg de peso vivo, sem variação entre tratamentos), foi previamente determinada (Lage et al., 2017) através de análise semanal das concentrações circulantes de progesterona, pela técnica de radioimunoensaio de fase sólida (ImmuChem Coated Tube, ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, CA), sendo o dia da puberdade estabelecido como o dia da elevação da concentração plasmática de progesterona ≥ 1 ng/ml, na condição de que na semana seguinte fosse também observada concentração novamente ≥ 1 ng/mL (Lage et al., 2017). Nos eventos em que houve elevação de progesterona ≥ 1 ng/ml sem consecutividade na próxima semana, este evento foi caracterizado como um ciclo ovariano curto.

A partir do momento que as novilhas atingiram 250 Kg de peso vivo, estas foram submetidas a avaliações do trato reprodutivo, por meio da palpação transretal, associada a ultrassonografia. Estas avaliações foram então realizadas cada 14 dias, utilizando-se aparelho de ultrassom acoplado a uma sonda linear de 7,5 MHz (DP 2200 Vet[®], Mindray,

China), operado por um técnico experientes. Os seguintes parâmetros foram avaliados: tônus uterino, diâmetro do corno uterino (no local imediatamente cranial a bifurcação dos cornos), tamanho dos ovários e diâmetro do maior folículo ovariano.

O tônus uterino foi avaliado por palpação transretal, sempre pelo mesmo técnico, seguindo a metodologia definida por Anderson et al. (1991), respeitando a seguinte escala: grau I- flácido; grau II- pouco flácido; grau III- pouco tônus; grau IV- tônus moderado e grau V- tônus túrgido. A determinação do diâmetro do corno do útero foi realizada posicionando-se o transdutor acima do terço médio de cada corno (direito e esquerdo), causando pressão mínima, para então evitar a deformação do mesmo. Foi medida o diâmetro (mm) de cada corno (direito e esquerdo) e calculada a média dos mesmos. As dimensões dos ovários e folículos (mm) foram obtidas em momento aleatório da onda folicular (por não haver controle da dinâmica folicular neste experimento) a partir da imagem ultrassonográfica, com as medidas de altura e comprimento, utilizando a fórmula: $(\text{maior raio} + \text{menor raio})/2$.

Uma vez que as avaliações ginecológicas foram realizadas a cada 14 dias, mas as coletas de sangue para avaliação de progesterona, a cada sete dias, o dia da puberdade (dia 0) de parte das novilhas ocorreu no mesmo dia de uma avaliação ginecológica, ao passo que, em outra parte das novilhas, o dia da puberdade foi determinado em semana intermediária a duas avaliações ginecológicas. O número de observações dos dados obtidos na avaliação ginecológica em diferentes momentos relacionados a semana da puberdade encontra-se na Tabela 1.

As avaliações foram realizadas até que as novilhas fossem destinadas para um protocolo de IATF. O protocolo de IATF foi atribuído a novilhas que atingiram os seguintes parâmetros: peso corporal mínimo de 350 kg e detecção de corpo lúteo (CL) em pelo menos duas semanas de avaliação reprodutiva após a detecção da puberdade. Dessa forma o n (total de 53) utilizado para as avaliações relacionadas a utilização da IATF foi de, respectivamente, para os tratamentos T1, T2, T3 e T4, de 14, 14, 12 e 13.

As novilhas passaram por sincronização de estro e inseminação artificial em tempo fixo (IATF), seguindo o protocolo apresentado na Figura 1. Todas as etapas do protocolo foram realizadas às 8 h. As palhetas de sêmen congelado utilizadas foram oriundas de central de Inseminação Artificial, sendo utilizada a mesma partida de um mesmo reprodutor. Aos 30 dias após a IATF foi realizado o diagnóstico de gestação por meio da ultrassonografia. Aquelas que não ficaram gestantes foram ressincronizadas e

inseminadas somente mais uma vez seguindo o mesmo protocolo de IATF e inseminada com o mesmo sêmen utilizado anteriormente.

Os dados foram analisados usando SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). As variáveis do escore do tônus uterino, do diâmetro do corno uterino, do diâmetro ovariano e do maior folículo ovariano foram analisadas pelo PROC MIXED do SAS. Variáveis discretas (incidência de ciclos curtos, fertilidade após a primeira IA e fertilidade após a segunda IA) foram analisadas pelo teste do qui-quadrado. Um valor de P igual ou menor que 0,05 foi considerado significativo.

Resultados e Discussão

Não foi observado efeito ($P > 0,05$) da dieta de aleitamento oferecida com quatro diferentes teores de matéria seca no leite integral nas variáveis escore do tônus uterino, diâmetro uterino e diâmetro do ovário, mas houve efeito da idade para as duas primeiras variáveis supracitadas. Nas figuras 2, 3 e 4 são apresentadas as médias das respectivas variáveis no decorrer das semanas antes e após a puberdade. Observou-se aumento progressivo esperado do tônus uterino até o momento da puberdade, não havendo efeito significativo até o fim do estudo (Figura 2).

A média do diâmetro do maior folículo foi $10,84 \pm 0,75$ mm e foi observado efeito ($P < 0,05$) para tratamento. Novilhas do T4 apresentaram maior diâmetro do folículo, quando comparado com o T1, porém semelhante aos animais do T2 e T3 (Figura 5). Novilhas do T4 apresentaram menor incidência de ciclos curtos ($P < 0,05$) quando comparados com T1 e T3, sendo semelhante a T2 (Figura 6).

A taxa de concepção dos animais independente dos aleitamentos recebido foi de 87%. Quanto à taxa de concepção na primeira IA, novilhas do T3 e T4 apresentaram maiores taxas (Figura 7). E quando submetidas a mais uma IA, novilhas do T2 apresentaram menor taxa de concepção que os demais tratamentos (Figura 8).

A oferta de maiores teores de matéria seca às bezerras determinou aumento da fertilidade das fêmeas púberes quando submetidas a um protocolo de IATF. Estes achados são inéditos na literatura quando comparados a outros estudos. Estudos anteriores, são baseados em análises de registros reprodutivos, aonde não apresentam controle de diferentes fatores, como do reprodutor utilizado, método de acasalamento, diferenças na categorização do escore do trato reprodutivo utilizado e efeito do tempo entre a puberdade e o primeiro serviço, o que torna difícil a comparação com os dados do presente estudo.

Alguns estudos, utilizando substitutos de leite enriquecidos com energia e proteína oferecidos durante o período de amamentação foram associados à idade precoce na puberdade (Rincker et al. 2011) ou a menor idade ao primeiro parto (Raeth-Knight et al. 2009) em fêmeas bovinas leiteiras. Da mesma forma, permitir bezerros amamentar em suas mães três vezes ao dia resultou em maior ganho de peso médio diário durante esse período e menor idade no primeiro parto, quando comparados com contrapartes recebendo somente substituto de leite e concentrado nos primeiros 42 dias de vida (Bar-Peled et al., 1997). Por outro lado, idade mais precoce na puberdade (Lage et al. 2017) ou no primeiro estro (Bar-Peled et al. 1997) e maior fertilidade (Rincker et al. 2011, Bar-Peled et al. 1997) não puderam ser observados em outros estudos que desafiaram bezerros com nutrição intensa mais cedo na vida. Contudo, há indícios que algum mecanismo gerado no útero e influenciado pela nutrição na fase inicial da vida possa ocorrer, afetando talvez o reconhecimento materno da gestação. Entretanto não há estudos em que possam ajudar entender tal modelação epigenética que a baixa nutrição possa causar no útero em um primeiro serviço em novilhas, já que em nosso estudo, novilhas ficaram prenhes em um segundo serviço. A maturação uterina final depende da estimulação alternada de estrogênio e progesterona, que ocorre somente após a formação do primeiro CL (Spencer e Bazer, 2004). Este processo inclui remodelação e diferenciação do epitélio glandular uterino sob a estimulação sequencial de estradiol e progesterona (Spencer e Bazer, 2004).

Conclusões

O aumento de sólidos totais no leite integral pela adição de sucedâneo de leite até 20,4% durante o período pré-desmame não afetou o diâmetro do corno uterino, o diâmetro do ovário e o tônus uterino, contudo, foi relacionado a menor ocorrência de ciclos curtos anteriores a puberdade, maior diâmetro do folículo ovariano observado em dia aleatório da onda folicular e a maior taxa de concepção após a primeira inseminação artificial.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brasil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Minas Gerais, Brasil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Minas Gerais, Brasil) e Embrapa Gado de Leite (Minas Gerais, Brasil) por apoiar financeiramente esta pesquisa.

Referências

- Azevedo, R. A., F. S. Machado, M. M. Campos, P. M. Furini, S. R. A. Rufino, L. G. R. Pereira, T. R. Tomich & S. G. Coelho (2016) The effects of increasing amounts of milk replacer powder added to whole milk on feed intake and performance in dairy heifers. *Journal of dairy science*, 99, 8018-8027.
- Bar-Peled, U., B. Robinzon, E. Maltz, H. Tagari, Y. Folman, I. Bruckental, H. Voet, H. Gacitua & A. R. Lehrer (1997) Increased Weight Gain and Effects on Production Parameters of Holstein Heifer Calves That Were Allowed to Suckle from Birth to Six Weeks of Age1. *Journal of Dairy Science*, 80, 2523-2528.
- Dyer R. M., Bishop M. D., Day M. L. (1990) Exogenous estradiol reduces inhibition of luteinizing hormone by estradiol in prepuberal heifers. *Biology of Reproduction*. 42, 755 – 761.
- Furini, P. M., R. A. Azevedo, S. R. A. Rufino, F. S. Machado, M. M. Campos, L. G. R. Pereira, T. R. Tomich, B. C. Carvalho, G. B. Santos & S. G. Coelho (2018) The effects of increasing amounts of milk replacer powder added to whole milk on mammary gland measurements using ultrasound in dairy heifers. *Journal of dairy science*, 101, 767.
- Jasper, J. & D. M. Weary (2002) Effects of ad libitum milk intake on dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 85, 3054-3058.
- Kesser, J., M. Korst, C. Koch, F. J. Romberg, J. Rehage, U. Müller, M. Schmicke, K. Eder, H. M. Hammon & H. Sadri (2017) Different milk feeding intensities during the first 4 weeks of rearing dairy calves: Part 2: Effects on the metabolic and endocrine status during calthood and around the first lactation. *Journal of dairy science*, 100, 3109-3125.
- Kiezebrink, D. J., A. M. Edwards, T. C. Wright, J. P. Cant & V. R. Osborne (2015) Effect of enhanced whole-milk feeding in calves on subsequent first-lactation performance. *Journal of dairy science*, 98, 349-356.
- Korst, M., C. Koch, J. Kesser, U. Müller, F. J. Romberg, J. Rehage, K. Eder & H. Sauerwein (2017) Different milk feeding intensities during the first 4 weeks of rearing in dairy calves: Part 1: Effects on performance and production from birth over the first lactation. *Journal of dairy science*, 100, 3096-3108.
- Lage, C. F. A., R. A. Azevedo, F. S. Machado, M. M. Campos, L. G. R. Pereira, T. R. Tomich, B. C. Carvalho, B. R. C. Alves, G. B. Santos, F. Z. Brandão & S. G. Coelho (2017) Effect of increasing amounts of milk replacer powder added to

- whole milk on postweaning performance, reproduction, glucose metabolism, and mammary fat pad in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 100, 8967-8976.
- Madwick S., Evans A. C. O., Beard A. P. (2005) Treating with GnRH 4 to 8 weeks of age advanced growth and age at puberty. *Theriogenology*. 63, 2323 – 2333.
- Ollivett, T. L., D. V. Nydam, T. C. Linden, D. D. Bowman & M. E. Van Amburgh (2012) Effect of nutritional plane on health and performance in dairy calves after experimental infection with *Cryptosporidium parvum*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241, 1514-1520.
- Raeth-Knight, M., H. Chester-Jones, S. Hayes, J. Linn, R. Larson, D. Ziegler, B. Ziegler & N. Broadwater (2009) Impact of conventional or intensive milk replacer programs on Holstein heifer performance through six months of age and during first lactation. *Journal of Dairy Science*, 92, 799-809.
- Rincker, L. E. D., M. J. VandeHaar, C. A. Wolf, J. S. Liesman, L. T. Chapin & M. S. W. Nielsen (2011) Effect of intensified feeding of heifer calves on growth, pubertal age, calving age, milk yield, and economics. *Journal of dairy science*, 94, 3554-3567.
- Schäff, C. T., J. Gruse, J. Maciej, M. Mielenz, E. Wirthgen, A. Hoeflich, M. Schmicke, R. Pfuhl, P. Jawor & T. Stefaniak (2016) Effects of feeding milk replacer ad libitum or in restricted amounts for the first five weeks of life on the growth, metabolic adaptation, and immune status of newborn calves. *PloS one*, 11, e0168974.
- Shamay, A., D. Werner, U. Moallem, H. Barash & I. Bruckental (2005) Effect of nursing management and skeletal size at weaning on puberty, skeletal growth rate, and milk production during first lactation of dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 88, 1460-1469.
- Soberon, F., E. Raffrenato, R. W. Everett & M. E. Van Amburgh (2012) Prewaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 95, 783-793.
- Terré, M., C. Tejero & A. Bach (2009) Long-term effects on heifer performance of an enhanced-growth feeding programme applied during the preweaning period. *Journal of dairy research*, 76, 331-339.
- Yunta, C., M. Terré & A. Bach (2015) Short-and medium-term changes in performance and metabolism of dairy calves offered different amounts of milk replacers. *Livestock Science*, 181, 249-255.

Semana relativa a puberdade	Número de observações				<i>Total</i>
	T1	T2	T3	T4	
-3	4	4	6	5	19
-2	5	2	2	4	13
-1	6	6	7	8	27
0	5	4	2	5	16
1	8	8	7	10	33
2	5	6	2	5	18
3	8	8	6	10	32
4	5	6	4	4	19
5	7	3	3	4	17
6	3	5	2	4	14
7	3	2	1	5	11
<i>Total</i>	59	54	42	64	219

Tabela 1: Número de observações obtidas durante os exames ginecológicos em novilhas em diferentes períodos relativos a detecção da puberdade. A semana 0 foi determinada como sendo a semana em que se detectou concentração a primeira concentração plasmática de progesterona ≥ 1 ng/ml, que foi necessariamente seguida por outra detecção de progesterona ≥ 1 ng/ml na semana subsequente.

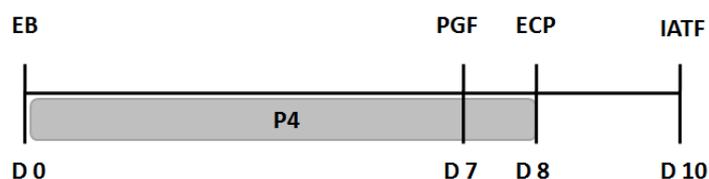


Figura 1. Diagrama esquemático do protocolo de sincronização de estro e inseminação artificial em tempo fixo (IATF). No dia 0 as fêmeas receberam o dispositivo intravaginal liberador de progesterona de segundo uso (CIDR[®], Zoetis Inc., New York, NY) com 1,9 g de progesterona e 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin[®]) i.m.; no dia 7 receberam 150 μ g de análogo sintético de PGF₂ α (cloprostenol, Croniben[®]) i.m.; no dia 8 foi retirado o implante vaginal e administrado 1 mg de cipionato de estradiol (ECP[®]) i.m. e no dia 10 foi realizada a inseminação artificial.

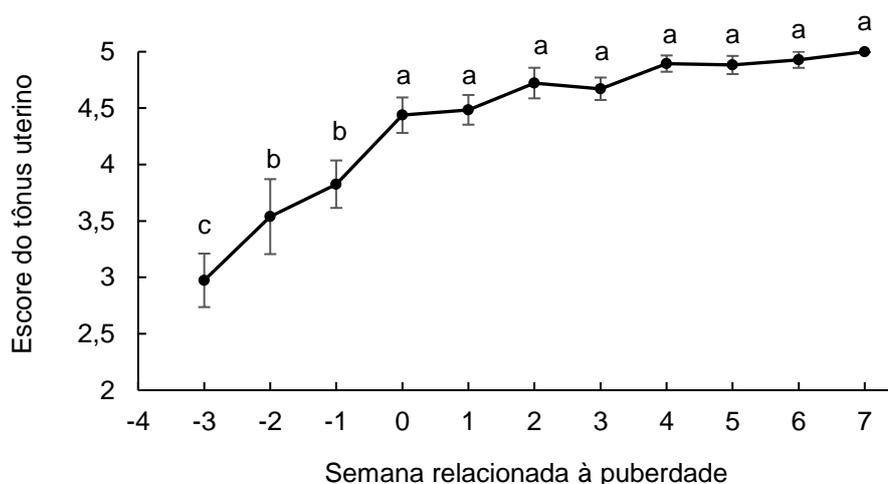


Figura 2. Escore do tônus uterino de novilhas mestiças Holandês x Gir (até 3/8 Gir) entre 4 semanas antes e 7 semanas após a puberdade.

a, b As médias seguidas por letra diferente diferem ($P < 0,05$).

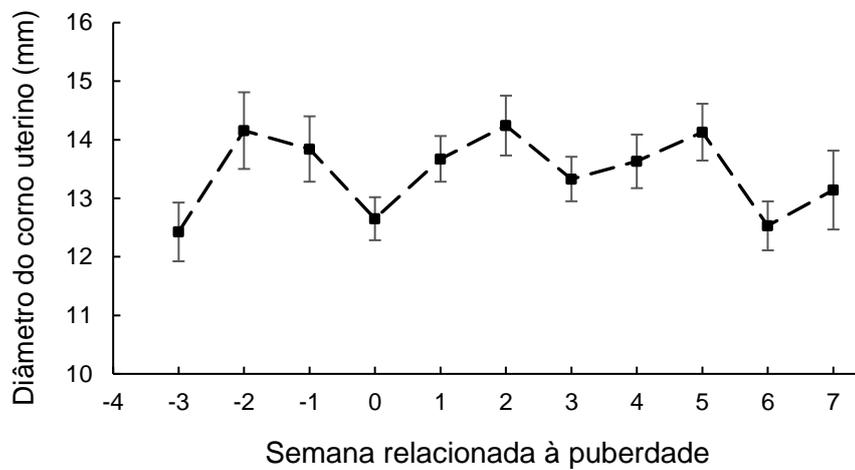


Figura 3. Diâmetro do corno uterino médio de novilhas mestiças Holandês x Gir (até 3/8 Gir) entre as 4 semanas antes e 7 semanas após a puberdade. ($P > 0,05$).

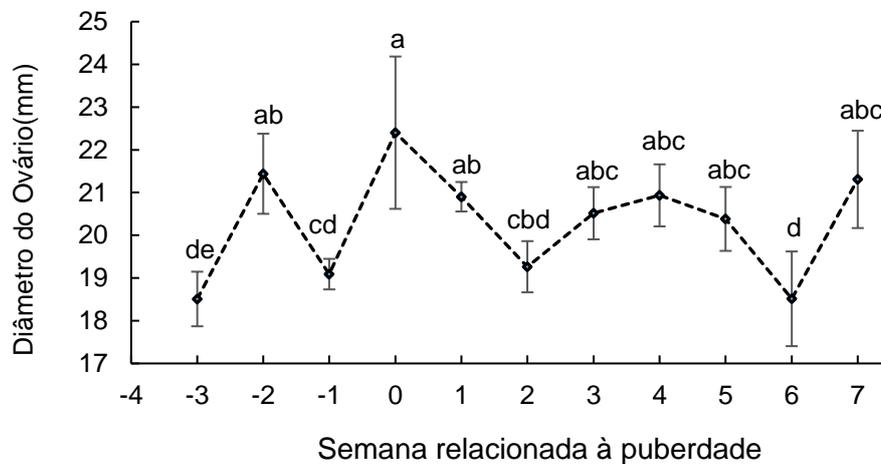


Figura 4. Diâmetro ovariano de novilhas mestiças Holandês x Gir (até 3/8 Gir) entre 4 semanas antes e 7 semanas após a puberdade.

a, b, c, d, e As médias seguidas por letra diferente diferem pelo teste de Fischer ($P < 0,05$).

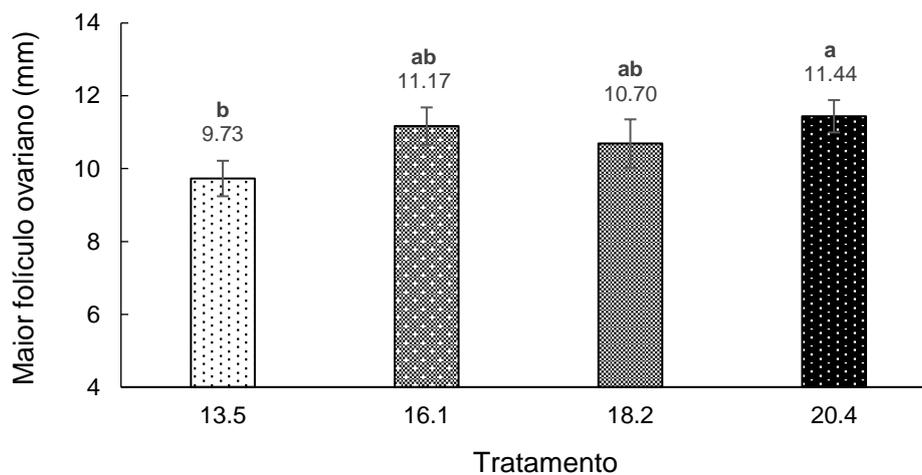


Figura 5. Diâmetro do maior folículo ovariano de novilhas mestiças Holandês x Gir (até 3/8 Gir) aleitadas com quatro diferentes teores de matéria seca no leite integral e avaliadas entre 4 semanas antes e 7 semanas após a puberdade.

^{a, b} As médias seguidas por letra diferente diferem pelo teste de Fischer ($P < 0,05$).

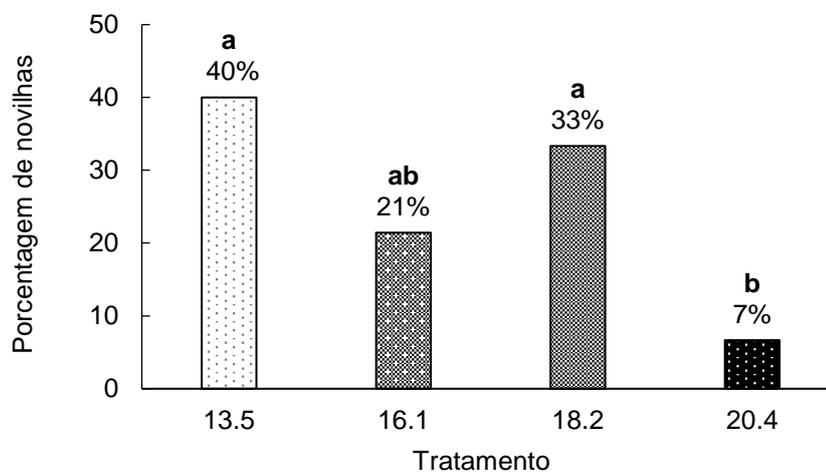


Figura 6. Porcentagem de ciclos curtos apresentado pelas novilhas mestiças Holandês x Gir (até 3/8 Gir) aleitadas com quatro diferentes teores de matéria seca no leite integral e avaliadas entre 4 semanas antes e 7 semanas após a puberdade.

^{a, b} As médias seguidas por letra diferente diferem pelo teste de Qui-quadrado ($P < 0,05$).

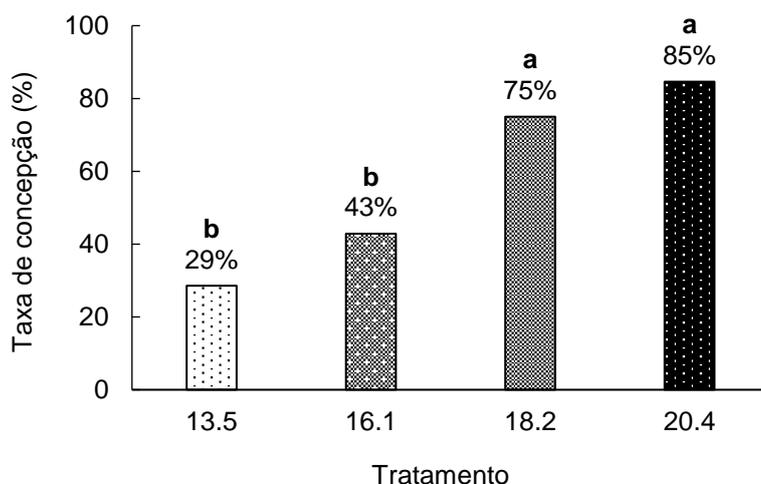


Figura 7. Porcentagem de concepção apresentado na primeira inseminação das novilhas mestiças Holandês x Gir (até 3/8 Gir) aleitadas com 4 diferentes teores de matéria seca no leite integral e avaliadas entre 4 semanas antes e 7 semanas após a puberdade.

^{a,b} As médias seguidas por letra diferente diferem pelo teste de Qui-quadrado ($P < 0,05$).

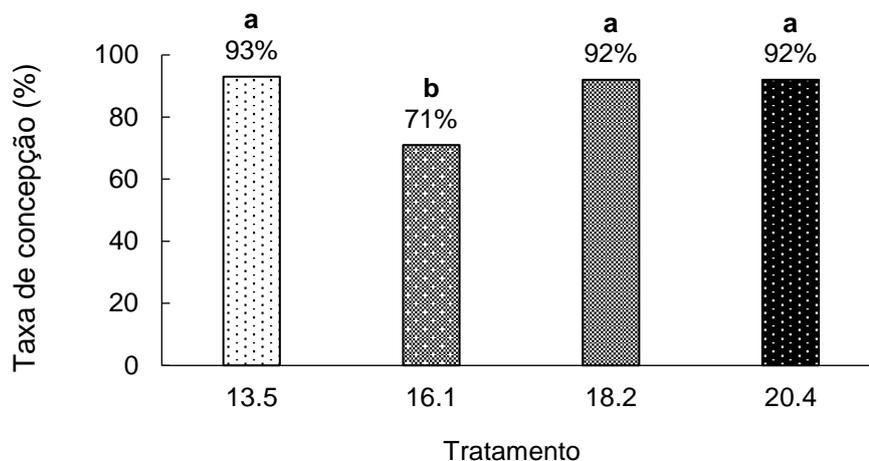


Figura 8. Porcentagem de concepção (acumulado) na primeira e segunda inseminação das novilhas mestiças Holandês x Gir (até 3/8 Gir) aleitadas com 4 diferentes teores de matéria seca no leite integral e avaliadas entre 4 semanas antes e 7 semanas após a puberdade.

^{a,b} As médias seguidas por letra diferente diferem pelo teste de Qui-quadrado ($P < 0,05$).

6 CAPÍTULO 3

Artigo publicado no periódico: Tropical Animal Health and Production

Aceito em: 4 de julho de 2018 **DOI:** 10.1007/s11250-018-1660-1

Qualis: B1 – Medicina Veterinária

Milk production and composition, food consumption and energy balance of postpartum crossbred holstein-gir dairy cows fed two diets of different energy levels

Gustavo Bervian dos Santos^{(1)*}; Felipe Zandonadi Brandão⁽¹⁾; Lilian dos Santos Ribeiro⁽¹⁾; Alexandre Lima Ferreira⁽²⁾; Mariana Magalhães Campos⁽²⁾; Fernanda Samarini Machado⁽²⁾; Bruno Campos de Carvalho^{(2)*}

⁽¹⁾Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 24230-340, Brazil

⁽²⁾Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36038-330, Brazil

*Corresponding author: gberviansantos@hotmail.com

Abstract- The objective of this study was to evaluate the different production, consumption and energy balance parameters of primiparous 3/4 and 7/8 Holstein x Gir

(HG) dairy cows fed two different diets of differing energy levels during the postpartum period. The 3/4 HG cows presented higher weight and body condition scores than the 7/8 HG (456.62 ± 7.90 and 428.91 ± 8.49 kg and 3.13 ± 0.03 and 2.94 ± 0.03 body condition score for 3/4 HG and 7/8 HG, respectively). Cows fed the high energy diet then presented a higher percentage of fat, protein, lactose and total dry extract than cows fed the low energy diet. Cows fed the high energy diet had higher net energy intake (95.29 ± 1.92 vs. 88.09 ± 2.05 MJ/ day) and higher energy balance (3.64 ± 2.13 vs -6.02 ± 2.30 MJ /day). The 3/4 HG cows displayed higher energy for maintenance (33.07 ± 0.41 MJ / day) than the 7/8 HG (31.52 ± 0.46 MJ /day). In conclusion, although the primiparous 3/4 HG were heavier than the 7/8 HG and presented a higher body condition score, no differences in milk produced up to 60 days postpartum was observed. A higher energy diet during the postpartum period was found to increase energy balance, resulting in higher production of fat, protein and lactose.

Keywords: dairy cattle; Girolando; energy consumption; milk composition; primiparous

Introduction

Given the higher average temperatures experienced by tropical countries throughout the year, tropical nations face distinct challenges in milk production when using European cattle breeds as these animals suffer from heat stress and metabolic changes in such conditions. As a result, it is important to study animals that are better adapted to tropical climates. The production of F1 crossbred females for dairy farms in this environment normally involves breeding zebu (*Bos indicus*) females with a Holstein bull to exploit the beneficial effects of heterosis (Santos et al., 2014).

At the beginning of lactation, there is an incompatibility between dry matter intake (DMI) and the energy required for milk production, and thus negative energy balance (NEB) occurs. We have seen remarkable advances in animal productivity in the last 75

years, with annual milk yield per cow increasing over four-fold and no evidence this increase is nearing a plateau. Thanks to these gains in productive efficiency, there have been dramatic reductions in resource inputs and the carbon footprint per unit of milk produced. The primary source for these historic gains relates to animal variation in nutrient partitioning (Baumgard et al., 2017). Animals with NEB are more likely to develop metabolic diseases, such as, ketosis, mastitis and placental retention, thereby impairing milk production and fertility (Daibert et al, 2018).

The production and composition of milk from crossbred Holstein x Gir cows are affected by various factors, such as the level of farm management and the ratio of crossbreed used. However, the body condition score (BCS) at calving, the energy balance in which the animal finds itself and the diet offered are important factors in determining the composition of milk.

Research shows that 3/4 HG and 7/8 HG cows produce higher quantities of milk when compared with animals of other genetic groups, but this production is decreased when the ratio of Gir genes is increased (Canaza-Cayo et al. 2017). These animals are responsible for most of the milk produced in the tropics. Thus, it is necessary to study the milk production and the energy balance that these animals experience in the early postpartum period according to the level of energy present in their diet in order to understand the differences between these cows and specialized breeds and to adapt the management of these animals in observance of their productive potential and requirements.

Thus, the objective of this study was to evaluate the different production, consumption and energy balance parameters of primiparous 3/4 HG and 7/8 HG dairy cows fed two different diets of differing energy levels during the postpartum period.

Material and Methods

Twenty-eight dairy crossbred primiparous females with a mean age of 35.64 ± 5.72 months were used, 15 of which had a genetic composition of 3/4 HG and 13 of which were 7/8 HG animals. At 28 days prepartum, females from the genetic group 3/4 HG presented 497.78 ± 10.67 kg, whereas the 7/8 HG presented 498.46 ± 12.74 kg, and the BCS was 3.5 ± 0.05 (scale from 1 to 5, Edmonson et al., 1989).

From 28 days of the expected calving, the animals were housed in a free-stall system with individual feed bins (Calan Gate, Calan Inc., New Hampshire, USA) for adaptation. The diet at this stage was provided ad libitum and consisted of corn silage plus 2 kg of concentrate per animal (21% crude protein, 8.45 MJ/kg of dry matter, 0.98% Ca and 0.5% P) based on corn, soybean bran, urea, common salt and a mineral nucleus. The feeding was provided assuming a minimum leftover of 5%. Ten days before their expected calving date, the animals were transferred and kept in maternity pens with access to pasture (*Cynodon dactylon*) until parturition whilst continuing to be fed the same diet. A mineral mixture and water were provided ad libitum during the entire prepartum period.

After calving, every week, the primiparous were weighed and evaluated for BCS (Edmonson et al. 1989) using a scale of 0.25. They were again housed in the free stall where they returned to the previous feeding system with individual feed bins until 61 days postpartum. At this time, the females were distributed homogeneously among the diets, in a 2 x 2 factorial arrangement (energy in the diet and genetic composition). The diets offered were either high energy (HE) or low energy (LE) (Table 1), with eight 3/4 HG animals and seven 7/8 HG animals fed the HE diet, and seven 3/4 HG animals and six 7/8 HG animals fed the with the LE diet. The diets were formulated using SuperCrac software (TD Software Ltda) and according to the nutritional requirements for growing Holstein cows producing 16 liters of milk/day as determined by the NRC (2001).

The cows were milked twice daily at 06:00 and 15:00 using a mechanized milking system equipped with a closed circuit with central middle line and digital milk meter. Milk control was performed daily and milk yield (MY) was recorded. MY was corrected to 3.5% fat (FCM) as per Sklan et al. (1992).

Samples were collected weekly to determine the composition of milk, with an equal number of samples taken from morning and afternoon milk production. The analytical principle applied was the differential absorption of infrared waves by the different components of the milk as per the International Dairy Federation (IDF, 2000).

As per Silva and Queiroz (2006), samples of the total diet offered at each treatment phase were analyzed for dry matter, ash, neutral detergent fiber (NDF), corrected neutral detergent fiber (NDfc), acid detergent fiber (ADF), crude energy (CE), ethereal extract (EE) and crude protein (CP)

The dry matter intake (DMI) was determined by calculating the difference between the offered diet and daily scraps in dry matter. The energy balance was estimated by calculating the difference between net energy intake (NEI) and the sum of net energy of maintenance (NEm) and net energy of lactation (NElac), expressed in MJ / day. The NEI, NEm and NElac were calculated according to the procedures laid out by the NRC (2001).

Data was analyzed using the SAS MIXED procedure, version 9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA), according to the following model:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + N_j + \delta_{ik} + W_l + (G \times N)_{ij} + (G \times W)_{ik} + (N \times W)_{jk} + \epsilon_{ijkl},$$

where:

μ = overall mean

G_i = fixed effect of the genetic group

N_j = fixed effect of the food plan (HE or LE)

δ_{jk} = covariance between repeated measures within animals

W1 = effect of first week

(G x N)_{ij} = effect of interaction between genetic group and food plan

(G x W)_{il} = effect of interaction between genetic group and first week

(N x W)_{jl} = effect of interaction between food plan and first week

ϵ_{ijkl} = effect of random error associated with Y_{ijkl} observation.

The experimental week was included as a repeated statement and the cow was nested within treatment as random effect. An autoregressive covariance structure was used to model the association among the repeated measurements. The comparison between means was achieved using the least squares means (LSMeans) test, where the significance level was set at 5% for all tests.

Results

The genetic composition of the female cows was found to have an effect on weight and BCS ($P = 0.024$ and $P = 0.010$, respectively), with 3/4 HG and 7/8 HG cows having a mean weight of 456.62 ± 7.90 and 428.91 ± 8.49 kg and a BCS of 3.13 ± 0.03 and 2.94 ± 0.03 respectively (Table 2). For MY and FCM, an effect of the postpartum week ($P = 0.029$ and $P = 0.029$, respectively) was observed (Table 2). The ECM was not affected by any of the analyzed variables ($P > 0.05$) (Table 2).

MY was lower in the first week postpartum, with an increase in MY achieved from the fourth week (Figure 1). FCM followed the same pattern, with lower results being recorded in the first two weeks postpartum and an increase observed from the third week (Figure 1).

There was a diet effect on the percentages of fat, protein, lactose and total dry extract in milk ($P = 0.013$, $p = 0.001$, $P = 0.011$ and $P < 0.0001$, respectively) (Table 2). Cows fed the HE diet produced milk with $4.25 \pm 0.12\%$ fat, $3.09 \pm 0.05\%$ protein, $4.65 \pm 0.03\%$

lactose and $12.89 \pm 0.14\%$ total dry extract (TDE) in their milk, while cows fed the LE diet produced milk with $3.8 \pm 0.13\%$ fat, $2.83 \pm 0.05\%$ protein, $4.53 \pm 0.03\%$ lactose and $11.97 \pm 0.16\%$ TDE (Table 2). In addition, there was a genetic group effect for protein ($P = 0.0104$). The 3/4 HG cows had a higher percentage of protein in their milk than the 7/8 HG cows (3.06 ± 0.05 and $2.86 \pm 0.05\%$, respectively). Moreover, there was a postpartum week effect for the percentage of protein in milk ($P < 0.0001$) (Table 2). The fat:protein ratio (F:P) was also affected by the postpartum week ($P = 0.0008$) (Table 2). The highest milk protein production (Figure 2) was recorded in the first week, and the milk from the primiparous HG presented a lower F:P ratio in the first two weeks, increasing from the third week (Figure 3).

Both NEI and BE were found to have dietary effects ($P = 0.015$ and $P = 0.0045$, respectively). Cows fed the HE diet had higher NEI (95.29 ± 1.92 vs. 88.09 ± 2.05 MJ / day) and higher BE (3.64 ± 2.13 vs. -6.02 ± 2.30 MJ / day) (Table 3) than others. In addition, genetic group had a significant effect on NEm ($P = 0.0245$). The 3/4 HG cows had higher energy for maintenance (33.07 ± 0.42 MJ / day) than the 7/8 HG (33.07 ± 0.46 MJ / day) (Table 3). Moreover, weeks postpartum had an effect on DMI, NEI and NEIac ($P = 0.0009$, $P = 0.022$ and $p = 0.001$, respectively) (Table 3). Finally, the CG x diet interaction had a significant effect on DMI, NEI and BE ($P = 0.020$, $P = 0.0175$ and $P = 0.004$, respectively) (Table 3).

NEI exhibited low levels in the first two weeks, followed by an increase and then remaining stable from the fourth week postpartum (Figure 2). Similarly, DMI presented low levels in the first two weeks postpartum, then increased and remained stable from week four (Figure 4). NEIac was lower in the first week of lactation, followed by an increase before reaching a peak in the fourth week (Figure 5).

The 7/8 HG cows fed the LE diet presented higher DMI than the 7/8 HG cows fed

the HE diet; however, no difference was observed among the 3/4 HG fed the HE or LE diet (Figure 6). Primiparous 3/4 HG fed the HE diet presented the highest NEI compared with the other combinations (Figure 7). Regarding BE, the 3/4 HG cows fed the LE diet presented the lowest BE in the study (Figure 8).

Discussion

The primiparous animals fed the HE diet produced milk with higher levels of protein, fat, lactose and TDE, which is explained by the higher ruminal availability of propionate, originating from the fermentation of non-fibrous carbohydrates (Delahoy et al., 2003). According to the NRC (2001), the protein content of the diet of cows does not affect the protein content in their milk, unlike non-fibrous carbohydrates as its concentration will lead to the higher production of ruminal propionate. The HE diet possibly provided higher ruminal propionate content since it contained greater amounts of concentrate and therefore of non-fibrous carbohydrates.

Energy deficit leads to increased lipolysis and absorption of mobilized fatty acids from body stores, which results in an increase in fat synthesis in the mammary gland (NRC, 2001). In addition, the flow of amino acids to the mammary gland is compromised, reducing the protein content in milk (revised by Baumgard et al., 2017) and resulting in a higher F:P ratio. A F:P > 1.5 ratio may indicate high lipolysis and may be a sign of the occurrence of ketosis, abomasal displacement, ovarian cysts, mastitis and laminitis (Daibert et al, 2018). A lower value may indicate acidosis and a higher value may indicate ketosis. In Gruber et al.'s (1995) study, the F:P ratio was higher in cows that received a LE diet at the beginning of lactation. The authors attributed this fact to the mobilization of adipose tissue caused by insufficient dietary energy and increased milk fat and decreased milk protein content caused by a decrease in the synthesis of microbial proteins

in the rumen. In this study there was no difference in the F:P ratio between the diets, but there was a postpartum week effect, with low results recorded in the first weeks postpartum with a subsequent increase. It is possible that with increased milk production, the primiparous animals need to mobilize greater body reserves to support the production of milk fat. However, there was a reduction in protein percentage, which is indicative of NEB.

Regarding crossbreeding, the 3/4 HG cows produced milk with a higher percentage of protein than the 7/8 HG. These higher percentages agree with the characteristics of the crossbreeding, as identified by Madalena et al. (1990) who observed higher protein and fat yield in milk from 3/4 HG cows as compared with 7/8 HG during the first lactation.

The nutritional needs of cows change abruptly at calving and early lactation. At these times, cows are not able to compensate for burgeoning energy demands through food consumption, resulting in NEB. This NEB, which can start before calving and reach its zenith two weeks later, leads to the mobilization of body fat and skeletal muscle (revised by Baumgard et al., 2017). It was found that the more abundant the energy in the diet, the higher the NEI and BE of postpartum primiparous crossbreds. That is, the HE diet was more efficient than the LE diet in providing energy to the cows to meet the increase in energy demand in the early postpartum period. Thus, the BE of the cows fed the HE diet was positive, whereas the BE of the cows fed the LE diet was negative, indicating that they had to mobilize body fat to supply the increased demand for energy.

In this study, there was no difference in MY, FCM or ECM between the two genetic groups. However, there were differences between the groups regarding weight and BCS. NEm is associated with live weight. The primiparous 3/4 HG presented a greater live weight than the 7/8 HG and therefore higher NEm. Moraes et al. (2015) find

that the increase in energy required to maintain cows in modern milk production systems is consistent with the literature describing the increase of heat production during the fasting of cows with the highest genetic merit. In this way, cows with greater productive potential would present higher NEm. Considering that the 7/8 HG cows have a higher proportion of Holstein genes (*Bos taurus*), this result disagrees with that of Oliveira (2015). The Oliveira (2015) study supports the hypothesis that *Bos taurus* dairy cows have higher maintenance energy requirements and greater energy efficiency for milk production than crossbred *Bos taurus* x *Bos indicus* dairy cows. These opposing findings reinforce the need for further studies comparing the energy requirements of different crossbreeds.

DMI and NEI followed the same pattern during the postpartum weeks, with a significant increase in DMI and NEI from the fourth week. When leaving the dry period and after calving, the animal begins lactation and experiences a sudden increase in energy demand for milk production (Grummer, 1995). In this early postpartum period, DMI increases gradually to fulfill this demand, as observed in this study. The digested products are assimilated, and the nutrients allocated to physiological steps that prioritize maintenance requirements and give secondary importance to productive functions, such as milk synthesis or fetal development. Subsequently, body reserves can be replenished or mobilized to meet the hierarchical objectives of nutrient traffic (Baumgard et al., 2017). Along with the increase in MY, there is also an increase in NElac, as observed in this study. The increase in NElac is accompanied by an increase in PL across the weeks.

The DMI of 7/8 HG cows differed according to the diet they received. Those fed the HE diet presented lower DMI than those fed the LE diet. Possibly, the 7/8 HG cows had their energy demands fulfilled faster with the HE diet, reducing daily consumption. Regarding BE, the 3/4 HG cows fed the LE diet presented significant negative BE.

Considering the higher live weight and NEM of this group, this poor-energy diet was not able to meet the energy demands of the animals, and as a result the cows mobilized body fat despite having a BCS than the 7/8 HG.

In conclusion, we can conclude that under the conditions of the present experiment the primiparous 3/4 HG were heavier than the 7/8 HG and presented a higher BCS yet no differences in liters of milk produced up to 60 days postpartum were identified. Moreover, a diet with higher energy content benefits energy balance, resulting in greater production of fat, protein and lactose when primiparous cows are fed HE diets.

Funding information

This study was supported by FAPEMIG and EMBRAPA. FZB is a fellow of the CNPq and GBS, LSR and ALF of CAPES.

Compliance with ethical standards

Statement of animal rights: The Animal Care Committee of Embrapa Gado de Leite approved the study design (protocol number #03/2012), and it was conducted according to the principles of the Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório, which regulates conditions for experiments involving animals.

Conflict of interest statement

There are no conflicts of interest to declare regarding the authorship or publication of this article.

References

- Baumgard, L. H., Collier, R. J., and Bauman, D. E. 2017. A 100-Year Review: Regulation of nutrient partitioning to support lactation. *Journal of Dairy Science*, *100*, 10353-10366.
- Canaza-Cayo, A. W., Lopes, P.S., Cobuci, J.A., Martins, M.F. and Silva, M.V.G.B., 2017. Genetic parameters of milk production and reproduction traits of Girolando cattle in Brazil. *Italian Journal of Animal Science*, 1-9.

Daibert, E., de Alvarenga, P. B., Rezende, A. L., Fagundes, N. S., Krüger, B. C., dos Santos, R. M., Mundim, A. V., and Saut, J. P. E. 2018. Metabolites able to predict uterine diseases in crossbred dairy cows during the transition period. *Semina: Ciências Agrárias*, 39(3), 1037-1048.

Delahoy, J.E., Muller, L.D., Bargo, F., Cassidy, T.W. and Holden, L.A., 2003. Supplemental carbohydrate sources for lactating dairy cows on pasture. *Journal of Dairy Science*, 86, 906-915.

Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T. and Webster, G., 1989. Body condition scoring chart of Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 72, 68-78.

Grummer, R.R., Hoffman, P.C., Luck, M.L. and Bertics, S.J., 1995. Effect of prepartum and postpartum dietary energy on growth and lactation of primiparous cows. *Journal of Dairy Science*, 78, 172-180.

Madalena, F.E., Lemos, A.M., Teodoro, R.L., Barbosa, R.T. and Monteiro, J.B.N., 1990. Dairy production and reproduction in Holstein-Friesian and Guzera crosses. *Journal of Dairy Science*, 73, 1872- 1886.

Moraes, L.E., Kebreab, E., Strathe, A.B., Dijkstra, J., France, J., Casper, D.P. and Fadel, J.G., 2015. Multivariate and univariate analysis of energy balance data from lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98, 4012-4029.

National Research Council –NRC Nutrient requirements of dairy cattle. 7 ed. Washington, D. C.: National Academic Press. 381p., 2001.

Oliveira, A. S., 2015. Meta-analysis of feeding trials to estimate energy requirements of dairy cows under tropical condition. *Animal Feed Science and Technology*, 210, 94-103.

Santos, S.A.; Valadares Silva, S.C.; Detman, E.; Ruas, J.R.M.; Prados, L.F.; Mariz, L.D.S. 2014. Intake, milk production and weight change curves for lactating Holstein x Zebu cows under grazing. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66, 827-836.

Silva, J. S. and Queiroz, A. C., 2002. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 235p.

Sklan, D. et al., 1992. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids and cotton seeds fed to high yielding cows. *Journal of Dairy Science*, 75, 2463-2472.

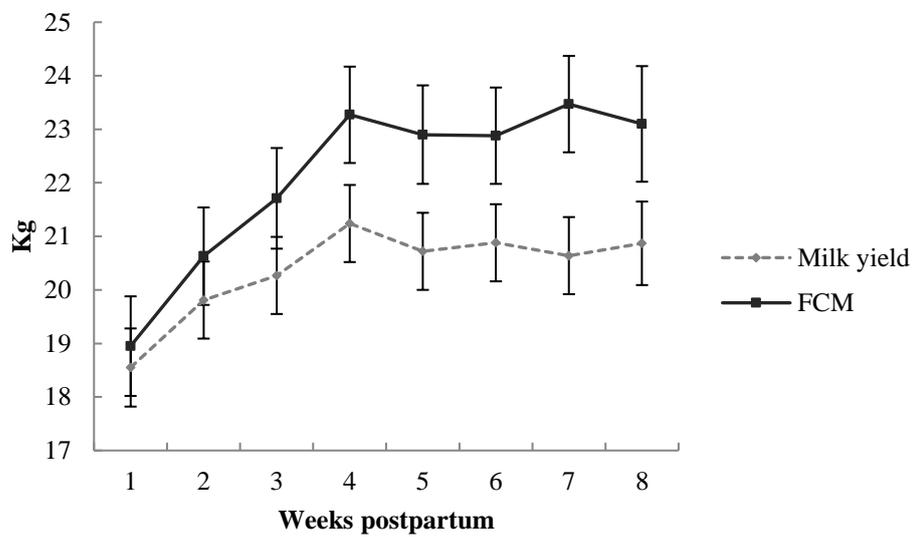


Figure 1- Milk yield (MY) and fat corrected milk (FCM) of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.

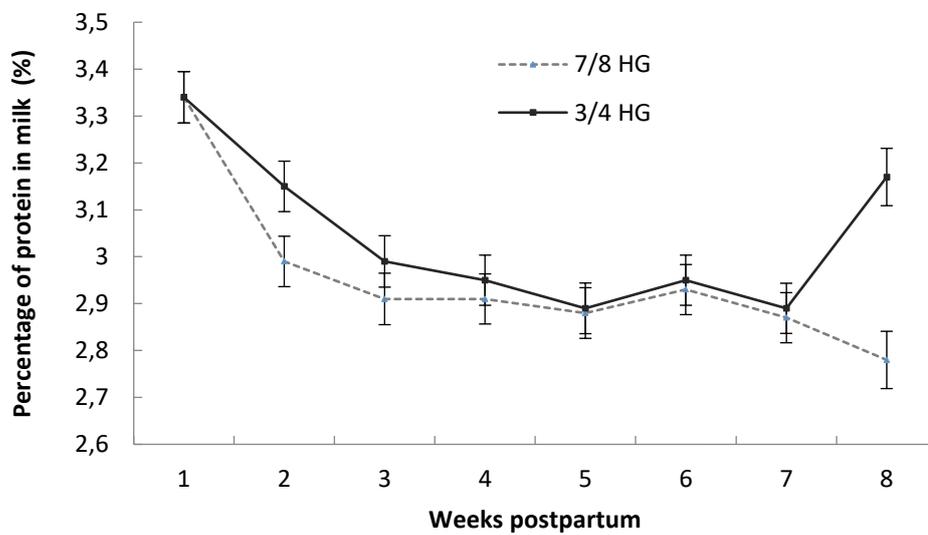


Figure 2- Percentage of protein in milk of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.

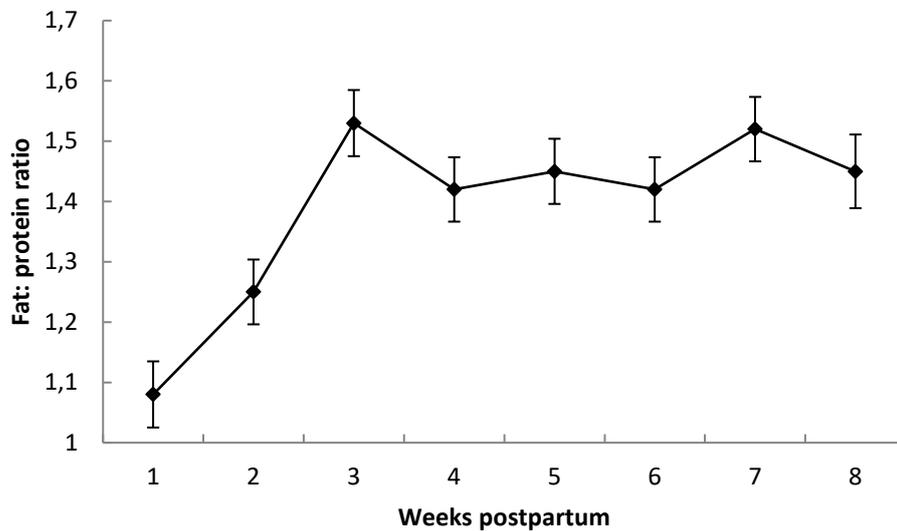


Figure 3- Fat:protein ratio (F:P) in milk of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.

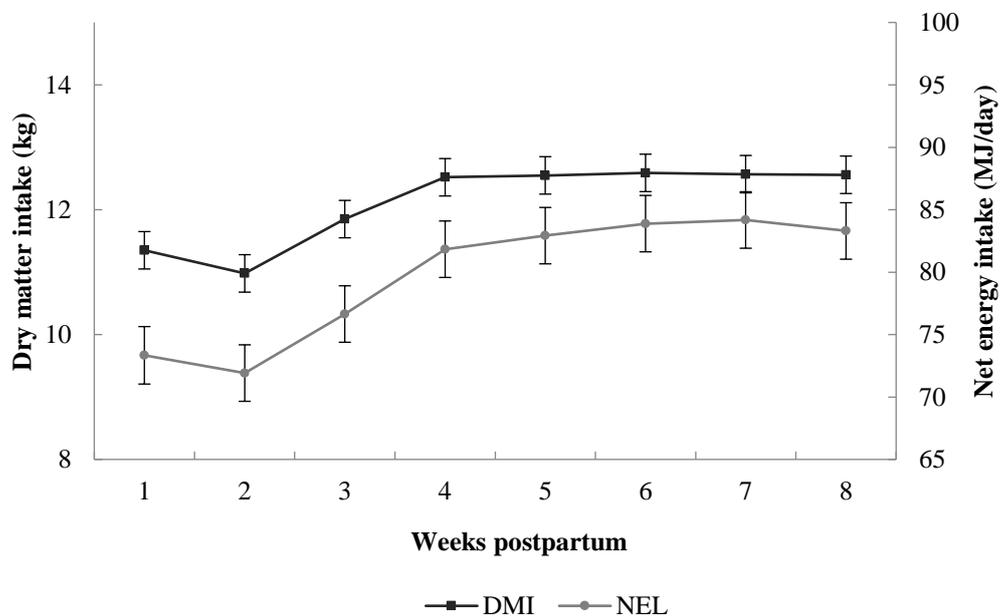


Figure 4- Dry matter intake (DMI) and net energy intake (NEI) of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.

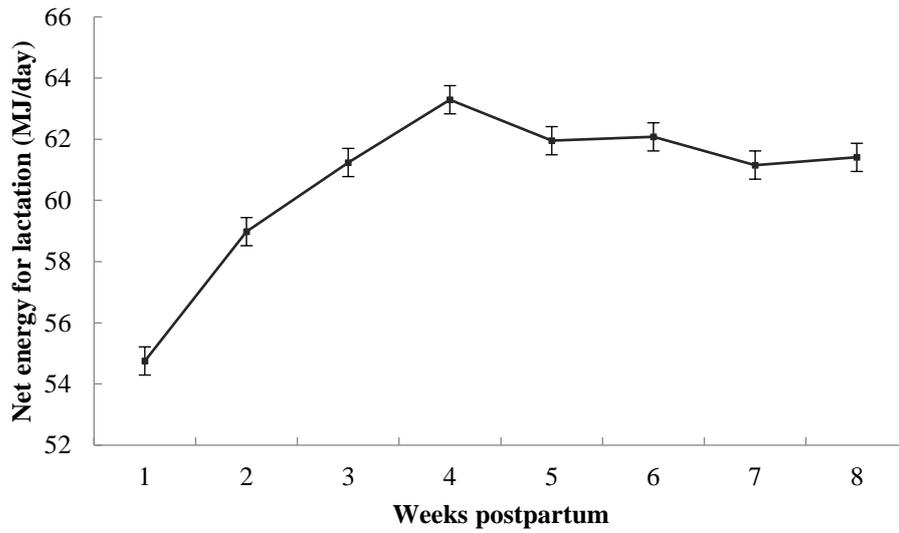


Figure 5- Net energy of lactation (NE_{lac}) of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.

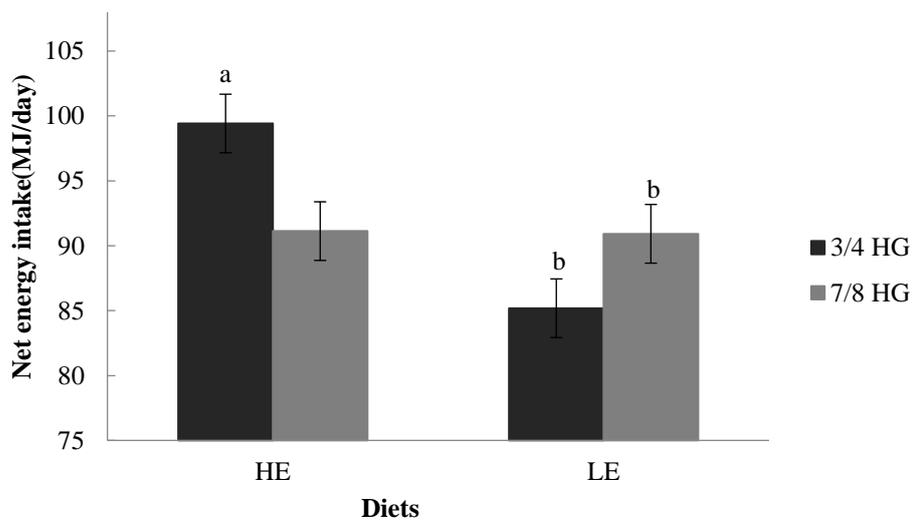


Figure 6- Dry matter intake (DMI) of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.

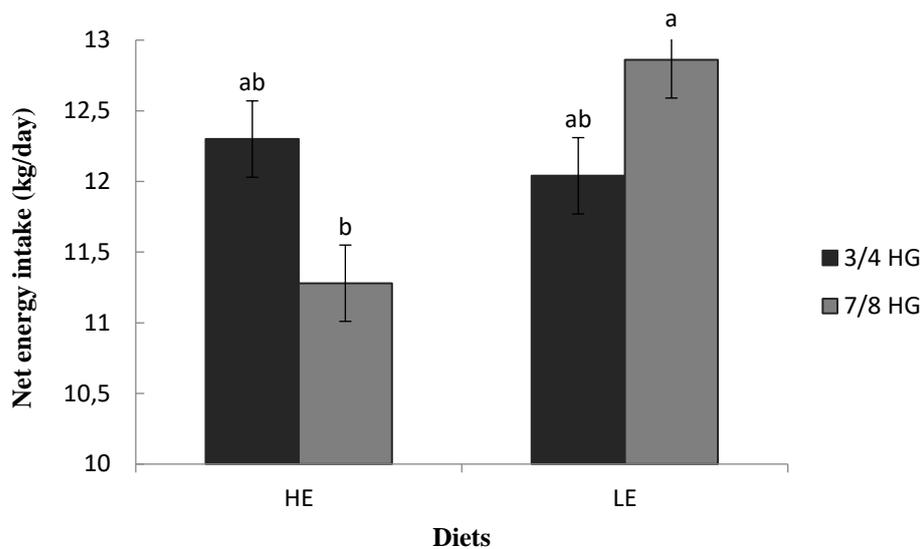


Figure 7- Net energy intake (NEI) of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.

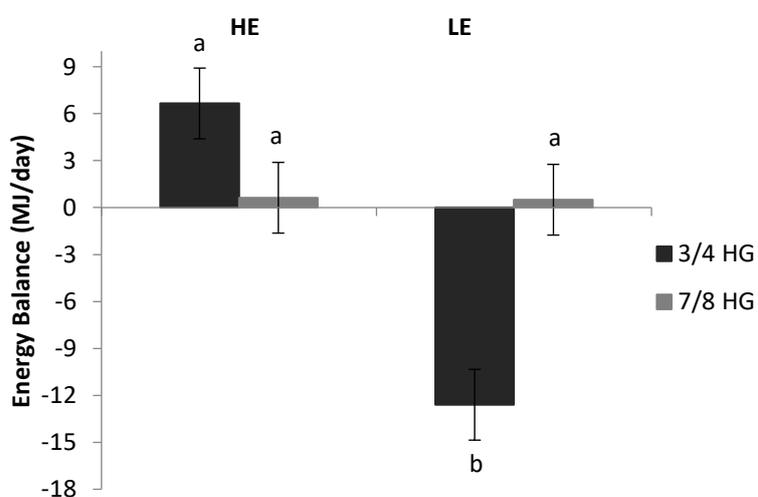


Figure 8- Energy balance of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.

Table 1- Composition of total diet provided to primiparous crossbred dairy cows during the early postpartum period

Diet Composition (Dry Matter basis)	Energy diet	
	High Energy (HE)	Low Energy (LE)
Corn silage, %	60.14	80.31
Soybean meal, %	11.61	11.78
Ground corn, %	25.08	4.68
Nucleus ¹ , %	2.10	2.14
Urea, %	1.07	1.09
Dry Matter, %	33.16	27.43
Crude Protein, kg/Dry Matter	0.17	0.17
Neutral Detergent Fiber, %	44	55
Calcium, g/kg	7.2	7.4
Phosphorus, g/kg	3.8	3.6
Net energy, MJ/kg	8.08	7.07

¹Mineral and vitamin composition: Calcium (190 g/kg), Phosphorus (60 g/kg), Sulphur (20 g/kg), Magnesium (20 g/kg), Potassium (35 g/kg), Sodium (70 g/kg), Cobalt (15 mg/kg), Copper (700 mg/kg), Chromium (10 mg/kg), Iron (700 mg/kg), Iodine (40 mg/kg), Manganese (1.60 mg/kg), Selenium (19 mg/kg), Zinc (2.50 mg/kg), Fluorine (600 mg/kg), Vitamin A (400.00 IU/kg), Vitamin D3 (100.00 IU/kg), Vitamin E (2.40 IU/kg).

Table 2- Effect of diet, genetic group, postpartum week on and their interactions with the weight, body condition, yield and milk composition of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period.

	Energy Diet		Genetic Group		SEM	P-value					
	HE	LE	3/4 HG	7/8 HG		Diet	GG	Week	Diet x Week	GG x Week	GG x Diet
Weight (kg)	439	447	457	429	8.50	0.50	0.02	0.05	0.12	0.21	0.77
BCS	3.04	3.03	3.13	2.94	0.03	0.12	0.01	0.12	0.98	0.21	0.16
MY (kg)	19.53	21.22	20.69	20.06	0.80	0.14	0.58	0.03	0.63	0.17	0.49
FCM (kg)	21.66	22.57	22.71	21.52	0.74	0.38	0.25	0.03	0.23	0.80	0.39
ECM (kg)	19.58	20.27	20.54	19.32	0.69	0.46	0.19	0.12	0.29	0.78	0.38
Fat (%)	4.25	3.80	4.05	4.00	0.13	0.01	0.78	0.21	0.33	0.65	0.84
Protein (%)	3.09	2.83	3.06	2.86	0.05	0.001	0.010	<0.0001	0.277	0.358	0.800
Lactose (%)	4.65	4.53	4.59	4.60	0.03	0.011	0.87	0.08	0.72	0.87	0.24
TDE (%)	12.89	11.97	12.54	12.32	0.15	<0.0001	0.34	0.93	0.60	0.83	0.95
F:P	1.37	1.37	1.35	1.38	0.40	0.96	0.53	0.0008	0.19	0.68	0.76

SEM: standard error of mean; BCS: body condition score; MY: milk yield; FCM: fat corrected milk; ECM: energy corrected milk; TDE: total dry extract; F:P: fat:protein ratio; GG: genetic group effect; Week: postpartum week effect; GG x Diet: genetic group and diet interaction; Diet x Week: diet and postpartum week interaction; GG x Week: genetic group and postpartum week interaction. P values in bold- indicate statistical significance (P < 0.05).

Table 3- Effect of diet, genetic group, postpartum week on and their interactions with food consumption and energy balance of primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 HG) fed low and high energy diets during the early postpartum period

	Diet		Genetic Group			P- value					
	HE	LE	3/4 HG	7/8 HG	SE M	Diet	GG	Week	Diet x Week	GG x Week	GG x Diet
DMI (Kg)	11.7	12.4	12.17	12.07	0.27	0.10	0.78	0.0009	0.53	0.997	0.02
NEI (MJ/day)	95.2	88.0	92.31	91.06	2.00	0.01	0.65	0.001	0.56	1.0	0.02
NE _m (MJ/day)	32.0	32.5	33.07	31.52	1.92	0.49	0.02	0.05	0.12	0.23	0.77
NE _{lac} (MJ/day)	59.6	61.6	62.21	58.99	2.13	0.50	0.28	0.02	0.56	0.43	0.35
EB (MJ/day)	3.64	-6.03	-2.97	0.54	2.26	0.004	0.27	0.06	0.76	0.82	0.004

SEM: standard error of mean; DMI: dry matter intake; NEI: net energy intake; NE_m: net energy of maintenance; NE_{lac}: net energy of lactation; EB: energy balance; GG: genetic group effect; Week: postpartum week effect; GG x Diet: genetic group and diet interaction; Diet x Week: diet and postpartum week interaction; GG x Week: genetic group and postpartum week interaction. Values of P in bold-faced, indicate statistical difference (P <0.05).

7 CAPÍTULO 4

Artigo publicado no periódico: Animal Production Science

Aceito em: 01/10/2018 DOI: 10.1071/AN18090

Qualis: B1 – Medicina Veterinária

Metabolic, follicular and embryo production responses of postpartum crossbred holstein × gir dairy cows fed diets with different energy levels

Gustavo Bervian dos Santos^A, Felipe Zandonadi Brandão^A, Lilian dos Santos Ribeiro^A, Eduardo Kenji Nunes Arashiro^A, João Gabriel Viana de Graziá^B, Luiz Sérgio de Almeida Camargo^C, Fernanda Samarini Machado^C, Fabiana Cristina Varago^D, Pamela Itajara Otto^E and Bruno Campos de Carvalho^{C,F}

^AFaculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil, 64, CEP 24230-340, Niterói, RJ, Brazil.

^BEscola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

^CEmbrapa Gado de Leite, Avenida Eugênio do Nascimento, 610, CEP 36039-330, Juiz de Fora, MG, Brazil.

^DUniversidade José do Rosário Vellano, Rodovia MG-179, CEP 37130-000, Alfenas, MG, Brazil.

^EDepartamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Avenida P.H. Rolfs, s/n, CEP 36571-000, Viçosa, MG, , Brazil.

^FCorresponding author. Email: bruno.carvalho@embrapa.br

The objective of the present study was to evaluate the effect of two diets with different energy levels and two genetic groups (3/4 and 7/8 Holstein × Gir (HG) cows) on the metabolic and hormonal changes and on the production profile of oocytes and embryos in dairy cows during the early postpartum period. The concentrations of oestrogen, progesterone, glucose, insulin, insulin-like growth factor, urea and non-esterified fatty acids in follicular fluid, as well as blood plasma concentrations of glucose, insulin, urea and non-esterified fatty acids, were evaluated. Oocyte collection was performed every 14 days after parturition. After classification, the oocytes were submitted to *in vitro* embryo production and cleavage, and blastocyst rates were evaluated. Five days after oocyte collection, the dominant follicle was measured and punctured for follicular fluid retrieval. The high-energy diet increased plasmatic insulin and glucose. The 3/4 HG cows presented a higher plasmatic concentration of insulin, glucose and urea. The hormonal and

metabolic changes in plasma were not observed in the follicular fluid. The follicular fluid concentration of IGF-I was increased in cows fed the high-energy diet as well as in the 3/4 HG cows. A higher number of total and viable oocytes was recovered in the 3/4 HG cows, but the 7/8 HG cows had a higher cleavage rate. In conclusion, the high-energy diet was more efficient in maintaining the energy status of crossbred cows, as evidenced by their plasma metabolites and follicular fluid, and 3/4 HG cows were more efficient than 7/8 HG cows at producing oocytes in the early postpartum period.

Additional keywords: animal reproduction, dairy milk production, lactation, milk production.

Introduction

When lactation begins, DM intake is unable to produce the energy required for milk production, and, thus, negative energy balance (NEB) occurs. We have seen remarkable advances in animal productivity in the past 75 years, with annual milk yield per cow increasing more than four-fold, and there being no evidence that this increase is nearing a plateau. Thanks to these gains in productive efficiency, there have been dramatic reductions in both resource inputs and the carbon footprint of milk production. The primary source of these historic gains is animal variation in nutrient partitioning (Baumgard *et al.* 2017). NEB is associated with decreased circulating concentrations of insulin, insulin-like growth factor (IGF-I) and glucose, and elevated concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA) and β -hydroxybutyrate, which are linked to impaired reproductive performance (Ospina *et al.* 2010). Animals with NEB are more likely to develop metabolic diseases, such as ketosis, mastitis and placental retention, and, thereby, suffer from impaired milk production and fertility (Daibert *et al.* 2018).

The quantification of circulating concentrations of metabolic parameters allows the monitoring of the physiological status of the animal, especially in early lactation when energy, protein and mineral requirements increase (Whitaker *et al.* 1999). A diet with greater amounts of concentrate and, consequently, higher levels of readily digestible carbohydrates, is provided at the beginning of the lactation period, so as to meet the elevated energy requirement associated with this period (Morrison *et al.* (1999).

The characteristics of the intrafollicular environment in which the preovulatory oocyte grows and matures may be a major determining factor of fertility in postpartum cows

(Leroy *et al.* 2004). Altered concentrations of metabolites and hormones in follicular fluid have already been linked with changes in oocyte capacity and embryo production (Hudson *et al.* 2014).

Crossbred Holstein × Gir (HG) cows are crucial for the Brazilian dairy industry. Therefore, it is important to expand our understanding of these animals, in particular the metabolic and hormonal changes they experience during the postpartum period, because this phase has a significant impact on milk production and reproductive performance. Crossbred HG cows have different proportions of Holstein and Gir genes, reflecting metabolic and hormonal differences. Zebu animals have higher circulating concentrations of insulin and IGF-I than do European breeds (Sartori *et al.* 2013). Several factors interfere in the production potential and reproductive efficiency of crossbred Holstein × Zebu cows. These factors include the choice of Zebu genetic base, the proportion of Holstein genes, the nutritional management of each category of the herd, particularities related to age and weight at first calving, the performance of primiparous cows and postpartum cow care (Borges *et al.* 2015).

The aim of the present study was to evaluate the effect of two diets of differing energy levels and two genetic groups (3/4 and 7/8 HG cows) on the metabolic and hormonal profiles of dairy cows, as well as on oocyte and embryo production during the early postpartum period.

Materials and methods

The study was conducted at the Experimental Farm José Henrique Bruschi of Embrapa Dairy Cattle, located in Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brazil (21°33'22"S, 43°06'15"W, altitude 484 m). The experiment was conducted with the approval of the Animal Care and Usage Committee of the Embrapa Gado de Leite (Protocol 03/2012), Brazil, and followed the ethical principles of the Sociedade Brasileira de Experimentação Animal.

Experimental animals, facilities and design

The experimental animals were 28 pregnant primiparous crossbred HG dairy cows, with an average age of 35.6 ± 5.7 months, an average weight of 498 ± 42 kg and an average body condition score of 3.5 ± 0.28 (scale 1–5). In terms of genetic makeup, of the 28 animals, 15 were 3/4 HG cows and 13 were 7/8 HG cows. The cows were blocked according to their genetic group and randomly allocated to the two diet groups in which

they received either high-energy (HE) or low-energy (LE) diets during the postpartum period, following a 2×2 factorial design (energy diet and genetic group). In the prepartum period, the 28 days before the likely calving date, the animals were housed in a free-stall barn with individual feed bins to help them adapt to the experiment facilities and diets. Ten days before the expected calving date, the animals were transferred to maternity pens where they received the same diet. After calving, the animals were transferred back to the free-stall barn where they were fed a HE or LE diet.

Prepartum management

During the prepartum period (the 28 days before the expected calving date), the animals were confined to a free-stall system with individual feed bins (Calan Gate®, Calan Inc., Northwood, NH, USA) to assure adaptation to their new facilities and diets. During this period, the animals were fed a prepartum diet composed of corn silage and 2 kg of concentrate (21% crude protein (2.02 Mcal/kg DM, 0.98% calcium and 0.5% phosphorus), based on ground corn, soybean meal, urea, common salt and mineral premix. The feed was provided assuming a minimum 5% leftover. Ten days before their expected calving date, the animals were transferred and kept in maternity pens with access to pasture (*Cynodon dactylon*) until parturition, but were fed the same prepartum diet. A mineral mixture at licking block and water was provided *ad libitum* during the full prepartum period.

Postpartum management

After parturition, the animals were transferred back to the free-stall barn and randomly allocated the experimental diets, following a 2×2 factorial design (energy diet and genetic group). In the HE group ($n = 13$, seven $3/4$ HG cows and six $7/8$ HG cows), the forage : concentrate ratio was 60 : 40, with 1.93 Mcal of net energy (NE)/kg of DM. In the LE group ($n = 15$, eight $3/4$ HG cows and seven $7/8$ HG cows), the forage : concentrate ratio was 80 : 20, with 1.69 Mcal of NE/kg of DM. The diet was total mixed ration, and the chemical composition of the diets is shown in Table 1. The experiment continued 62 days into the lactation stage.

Determination of metabolic and hormonal parameters

Concentrations of glucose, urea, NEFA and insulin were determined in the plasma and follicular fluid of the dominant follicle (FFD). Furthermore, concentrations of IGF-I, oestradiol and progesterone was also determined in the FFD.

Glucose was determined by an endpoint colourimetric reaction (Glicose Pap Liquiform, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil). Urea was determined by an enzymatic reaction and ultraviolet photometry (Ureia UV Liquiform, Labtest). Analyses were performed with commercial kits using an automatic monochromatic reading system (Labmax premium 240®, Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, MG, Brazil), while NEFA concentration was determined by applying the colourimetric method using commercial kits (Randox NEFA FA115, Randox Laboratories Ltd, Antrim, Ulster, United Kingdom). Samples were then analysed in a spectrophotometer (Eon®, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA).

Oestradiol, IGF-I, insulin and progesterone concentrations were determined by radioimmunoassay using commercial kits (Oestrogen Immunotec®, IGF-1 Immunotec®, Insulin Immunotec®, and Progesterone Immunotec®, Immunotec, Marcelle, France). The sensitivity of the kits for oestradiol, IGF-I, insulin and progesterone was 2.2 pg/mL, 2.0 ng/mL, 2.0 ng/mL and 0.05 ng/mL respectively. Intra-assay coefficients for oestradiol, IGF-I, insulin and progesterone were 9%, 10%, 9% and 7% respectively. Follicular fluid samples with blood contamination were discarded. Only follicles with oestradiol : progesterone ratio ($E_2 : P_4$) of >1 were considered viable, and, thus, only data from these samples were used for the evaluation of other hormones and metabolites. Follicular fluids with $E_2 : P_4$ of <1 were considered atresic and were discarded (Renaville *et al.* 2010).

Oocyte and follicular fluid-sample collection

Synchronisation of follicular wave emergence, oocyte collection and FFD sampling were performed by ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration (Sales *et al.* 2015). Oocyte collection was performed every 14 days after parturition (on Days 14, 28, 42 and 56). Follicular wave emergence was synchronised 72 h before oocyte collection by aspiration of antral follicles ≥ 6 mm in diameter (Sales *et al.* 2015). In brief, ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration was performed using a portable ultrasound device equipped with a 7.5-MHz transvaginal convex transducer (DP 2200 Vet®, Mindray, Shenzhen, China). After the animal was restrained and the perineal area sanitised, an epidural anaesthesia was performed using 3–5 mL of lidocaine 2% (Lidovet®, Bravet, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The aspiration system consisted of a 20-G needle (WTA, Sao Paulo, Brazil) of 80 cm in length and 1.7 mm in diameter connected to a Teflon circuit. Aspiration was performed under negative pressure between 50 and 60

mmHg. All the follicles visualised were aspirated and the oocytes retrieved were received in 50-mL tubes with PBS and 1% fetal calf serum combined with 125 IU of sodium heparin/mL (Liquemine, Roche, São Paulo, SP, Brazil).

The recovered oocytes were evaluated according to their morphological quality and classified as Grade I (GI), Grade II (GII), Grade III (GIII) and Grade IV (GIV) as previously described (Viana *et al.* 2004). Oocytes classified as GI, GII and GIII were considered viable. These oocytes were transported to a commercial *in vitro* embryo-production laboratory in 1.5-mL tubes containing a TCM199 Earle's salts (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) solution with 10% fetal calf serum. Oocyte transportation was performed in thermos bottles at 37°C. The laboratory was 32 km away from the farm where the oocytes were collected. The follicular fluid of dominant follicles was individually recovered in 1.5 mL tubes and stored at -20°C until analysis.

Four days (96 h) after oocyte collection, the dominant-follicle diameter was evaluated by means of two perpendicular measurements of the axis of the follicle. A second evaluation was performed after 24 h (120 h after oocyte collection) to determine the dominant-follicle diameter. The growth rate was calculated by comparing the difference in diameter between the 2 days. The fluid of the dominant follicle was then recovered by transvaginal aspiration (Arashiro *et al.*, 2013). The FFD was recovered at 19, 33, 47 and 62 days postpartum.

In vitro embryo production

In vitro maturation (IVM) and fertilisation was performed as previously described by Torres-Junior *et al.* (2008). In brief, the oocytes were subjected to *in vitro* maturation in TCM199 Earle's salts media with 10% fetal calf serum, 0.5 mg/mL follicle-stimulating hormone, 50 mg/mL luteinising hormone, 4.4 mg/mL pyruvate and 50 mg/mL antibiotic (Grázia *et al.* 2016). The oocytes were matured for 24 h in an incubator at 38.8°C, 5% CO₂ and 95% humidity. Oocytes from each donor were individually matured in 70-µL droplets, with a maximum of 30 oocytes per droplet. Subsequently, matured oocytes were fertilised in 60-µL droplets of *in vitro*-fertilisation media (Vitrogen, São Paulo, SP, Brazil) with heparin and 2×10^6 spermatozoa/mL for 18–22 h at the same incubator temperature and atmosphere as used in IVM. The frozen semen of a single bull with proven fertility (cleavage rate of 70%) was thawed and used for *in vitro* fertilisation. Viable sperm cells were selected using the Percoll gradient method (Camargo *et al.* 2011). Presumable zygotes were co-cultivated with granulosa cells in CR4aa media (Vitrogen)

with 2.5% fetal calf serum and 5% bovine serum albumin. *In vitro* culture was performed in 50- μ L droplets for 7 days at the same incubator temperature and atmosphere as used in IVM. Evaluations of cleavage rates and blastocyst rates were performed 3 and 7 days after beginning *in vitro* culture respectively.

Plasma sample collection

Prior to FFD sampling, a blood sample was collected by coccygeal venipuncture in 5-mL evacuated tubes containing EDTA (Vacutainer®, BD, Juiz de Fora, MG, Brazil). Blood samples were stored in a refrigerated container (5°C) and transported to the laboratory. Then, blood samples were centrifuged for 15 min at 800g at 5°C and plasma was stored at -20°C until analysis. The interval between blood-sample collection and centrifugation was no longer than 2 h.

Statistical analyses

The effect of the animal diet, genetic group, postpartum period and the interaction between these factors as well as random effects were incorporated into a linear mixed model ANOVA (PROC MIXED). Least square means were compared using Tukey's test. Discrete variables (viable oocyte rate, cleavage rate and blastocyst rate) were analysed using the chi-square test. A *P*-value equal to or less than 0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using SAS in Windows 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

The plasma concentration of glucose was affected by diet ($P = 0.0025$), genetic group ($P = 0.0194$) and days postpartum ($P = 0.0018$). The plasma insulin was affected by diet ($P = 0.0394$) and genetic group ($P = 0.0155$). The plasma urea was affected by diet and genetic group interactions ($P = 0.0156$). The plasma NEFA was affected by diet ($P = 0.0553$) and days postpartum ($P = 0.0526$).

Cows fed the HE diet presented higher plasmatic glucose and insulin concentrations than did cows fed the LE diet ($P < 0.05$; Table 2). In contrast, the plasma NEFA was higher in cows fed the LE diet ($P < 0.05$; Table 2). The 3/4 HG cows presented significantly ($P < 0.05$) higher concentrations of glucose, insulin and plasma urea than did the 7/8 HG cows. Plasma glucose increased from 19 to 33 days postpartum and then remained constant (Fig. 1). A significant decrease in plasma NEFA was observed from 19 to 61 days postpartum (Fig. 2).

No significant ($P > 0.05$) effect was observed on the follicular-fluid concentrations of glucose, insulin, urea, NEFA and P_4 . However, the follicular fluid concentration of IGF-I (IGF-1FF) was affected by diet ($P = 0.0392$), genetic group ($P = 0.0266$) and days postpartum ($P < 0.0001$). Moreover, the follicular fluid concentration of oestradiol was affected by days postpartum ($P = 0.0494$), and the $E_2 : P_4$ ratio was affected by genetic group ($P = 0.0037$; Table 2).

Cows fed the HE diet presented a significantly ($P < 0.05$) higher IGF-1 in their follicular fluid than did cows fed the LE diet (Table 2). The 3/4 HG cows presented significantly ($P < 0.05$) higher concentrations of IGF-1 in their follicular fluid than did the 7/8 HG cows. A significant increase in IGF-1FF was observed at 47 days postpartum (Fig. 1). A significant increase in oestradiol was observed between 19 and 61 days postpartum (Fig. 1). The $E_2 : P_4$ ratio also was higher in 3/4 HG cows than in 7/8 HG cows (Table 2).

The number of small follicles, larger follicles and total follicles was significantly ($P = 0.0033$, $P = 0.0144$ and $P = 0.0009$ respectively) affected by days postpartum. The diameter of the dominant follicle was, likewise, significantly ($P = 0.0416$) affected by days postpartum. The average dominant-follicle diameter was 10.08 ± 0.22 mm 5 days (120 h) after oocyte collection. The average DF growth rate (between 96 h and 120 h after oocyte collection) was 2.19 ± 0.26 mm/day. The total number of follicles and the diameter of the dominant follicle showed a significant increase between 19 and 61 days postpartum (Fig. 3).

For cows fed the LE diet, primiparous 3/4 HG cows presented a higher plasma urea than did the 7/8 HG cows (33.36 ± 2.09 vs 23.68 ± 2.28 ng/mL respectively).

The total number and number of viable oocytes recovered was not affected by dietary energy levels or days postpartum. However, the number of total and viable oocytes recovered was affected by genetic group ($P = 0.0078$). The number of oocytes (total and viable) was greater in 3/4 HG cows than in 7/8 HG cows. Moreover, a dietary and genetic group interaction affected the viable-oocyte rate, with 7/8 HG cows fed LE diets presenting the lowest percentage of viable oocytes (Table 3).

Cleavage rates were lower in 3/4 HG cows fed the LE diet (Table 4). The blastocyst rate did not differ according to diet or genetic group. However, diet and genetic group interactions were observed to affect the rate of blastocysts per cleaved oocytes. The 7/8

HG cows fed the HE diet produced the lowest rate of blastocysts by cleaved oocytes. In addition, the postpartum period affected the cleavage and blastocyst rates. The highest cleavage rate was observed at 14 days postpartum, while the lowest blastocyst rate was observed at 42 days postpartum (Fig. 4).

Discussion

Increasing our knowledge of metabolic and hormonal changes, ovarian activity and oocyte and embryo production during the postpartum period in crossbred HG animals is vital to improving the fertility and milk production of these animals in tropical conditions. The present study evaluated the effect of diet energy levels (HE or LE) and two genetic groups (3/4 and 7/8 HG cows) on metabolic and hormonal profiles as well as oocyte and embryo production in the postpartum period.

A higher proportion of concentrate in the diet of dairy cows during the early postpartum period is a well-known strategy to increase energy intake and avoid or attenuate the deleterious effects of NEB (Van Knegsel *et al.* 2014). A greater proportion of concentrate in the diet increases the ruminal concentration of propionate, which is the main glucose precursor (Rabelo *et al.* 2005). Insulin is the main metabolic hormone and is responsible for glucose capture by the cells (Bell, 1995). In the present study, cows fed the HE diet displayed better adaptation to NEB during the peripartum period, presenting higher plasma concentrations of glucose and insulin.

This better adaptation led to lower adipose-tissue mobilisation, with lower plasmatic NEFA concentrations observed in cows fed the HE diet. According to Doepel *et al.* (2002), high-energy diets applied during the peripartum period improve DM intake and stimulate insulin secretion, thereby reducing lipolysis levels and, consequently, decreasing circulating levels of NEFA. This improvement in energetic metabolism and insulin availability during the peripartum period enhances the animal liver function, general health and fertility (Gong *et al.*, 2002).

Non-esterified fatty acids play a central role in oocyte quality in the postpartum period. An increase of NEFA in the follicular fluid is linked to the lower quality of oocyte, implying a loss of fertility in cows (Van Hoeck *et al.* 2014). A progressive increase in plasma concentration of NEFA is expected during the early postpartum period because milk production and, consequently, energy requirements are increased and consumption does not meet demand. However, this effect was not observed in the present study. Rather, plasma concentrations of NEFA progressively decreased from Day 19 to Day 61

postpartum. This decrease of NEFA concentrations in plasma can be explained by the lower milk yield, and, thus, reduced energy requirements, of crossbred cows than high-yield cows such as Holsteins. Lower milk yield and energy requirements will reduce the effects of NEB. Corroborating the study by Leroy *et al.* (2004), intrafollicular concentrations of NEFA remained constant and lower than the plasma concentrations during the postpartum period, suggesting a mechanism of protection of oocyte and granulosa cells against high concentrations of NEFA.

The genetic group of 3/4 HG cows had higher plasma concentrations of glucose, insulin and urea and a higher IGF-1 and $E_2 : P_4$ ratio in their follicular fluid. Sartori *et al.* (2016) found a lower production of preovulatory oestrogen and lower plasmatic insulin concentration in Holstein cows (*Bos taurus*) than in Nelore cows (*Bos indicus*). Plasma concentration of glucose was higher in *Bos indicus* than in *Bos taurus* cows (Sartori *et al.* 2013). The differences between *Bos indicus* and *Bos taurus* can also be observed in crossbred animals, for example, in relation to *in vitro* embryo production (Pontes *et al.* 2010). Therefore, the metabolic differences observed between 3/4 and 7/8 HG cows can be attributed not only to milk production but also to genetic composition.

Urea is synthesised by the liver in amounts proportional to the ruminal concentration of ammonia (Wittwer *et al.* 1999). Plasma concentration of urea was higher in 3/4 HG cows fed the LE diet. This result suggests that the ruminal concentration of ammonia was greater in 3/4 HG cows. It is possible that protein metabolism in this genetic group was more efficient when a diet featuring a lower proportion of concentrate was provided.

During the postpartum period, plasma glucose, follicular-fluid concentration of oestradiol and IGF-I progressively increased. The resumption of ovulatory cycles is related to nutritional status, insulin concentration and NEB (Santos and Vasconcelos, 2006). In early lactation, the concentration of GH is increased, resulting in a rise in the IGF-1 produced in the liver. However, the expression of GH receptors in the liver is dependent on insulin (Butler *et al.* 2003). In our study, the high-energy diet and the 3/4 HG cows presented a higher concentration of IGF-I in follicular fluid. This can be attributed to the higher plasma concentrations of insulin.

The number of oocytes (total and viable) recovered was greater in 3/4 HG cows than in 7/8 HG cows. This result corresponds to previous studies that have demonstrated a greater number of oocytes (total and viable) recovered in purebred Gir and crossbred HG

cows than in Holstein cows (Pontes *et al.* 2010). The number of oocytes recovered in the present study was lower than that found by Pontes *et al.* (2010), who obtained a mean of 20.4 and 31.4 oocytes per ovum pick up for crossbred 1/4 HG and 1/2 HG respectively. In light of this, we believe that the higher Holstein genetic composition of 7/8 HG cows in the present study, which are closer to purebred Holsteins, contributed to the decreased oocyte production.

Reduced reproductive performance during early lactation is due to reduced pulsatile release of luteinising hormone, reduced circulating concentrations of insulin, IGF-I and glucose, along with increased NEFA, β -hydroxybutyrate and growth hormone (Butler *et al.* 2003; Butler *et al.* 2004). The 3/4 HG cows may have experienced higher production of total and viable oocytes due to the better metabolic status observed in this genetic group in the present study.

Oocyte competence for *in vitro* embryo production can be estimated by cleavage and, preferentially, by blastocyst rates (Sirard *et al.* 2006). Despite the greater number of morphologically viable oocytes recovered in the 3/4 HG cows, the cleavage rate was superior in oocytes derived from 7/8 HG cows, which have a larger proportion of Holstein genes. However, no difference in blastocyst rate was observed. The low blastocyst rate identified in the present study may be related to the small diameter of the dominant follicles, which, in turn, will be related to adequate E2 production (Wiltbank *et al.* 2011).

In conclusion, the HE diet was more effective at maintaining the energetic status of crossbred cows at the beginning of lactation. This is evidenced by the plasmatic concentrations of glucose, insulin and NEFA, as well as follicular fluid concentration of IGF, indicating less mobilisation of body reserves and a lower intensity of negative energy balance. During the postpartum period, there is an increase in the plasma concentration of glucose and a possible improvement of the follicular environment caused by the increase in the concentration of oestradiol and IGF-1. Crossbred 3/4 HG cows were more efficient than 7/8 HG cows at producing oocytes in the early postpartum period, although they presented lower rates of cleavage than did 7/8 HG cows.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Minas Gerais, Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), and

Embrapa Gado de Leite (Minas Gerais, Brazil) for financial support. EKNA is a postdoctoral fellow financed by FAPERJ.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Arashiro EKN, Palhão MP, Wohlfres-Viana S, Siqueira LGB, Camargo LSA, Henry M, Viana JHM (2013) In vivo collection of follicular fluid and granulosa cells from individual follicles of different diameters in cattle by an adapted ovum pick-up system. *Reproductive Biology and Endocrinology* **11**, 73–80. doi:10.1186/1477-7827-11-73
- Baumgard LH, Collier RJ, Bauman DE (2017) A 100-year review: regulation of nutrient partitioning to support lactation. *Journal of Dairy Science* **100**, 10353–10366. doi:10.3168/jds.2017-13242
- Bell AW (1995) Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science* **73**, 2804–2819. doi:10.2527/1995.7392804x
- Borges ÁM, Martins TM, Nunes PP, Ruas JRM (2015) Reprodução de vacas , mesticas: potencialidade e desafios. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **39**, 155–163.
- Butler ST, Marr AL, Pelton SH, Radcliff RP, Lucy MC, Butler WR (2003) Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *The Journal of Endocrinology* **176**, 205–217. doi:10.1677/joe.0.1760205
- Butler ST, Pelton SH, Butler WR (2004) Insulin increases 17 β -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction (Cambridge, England)* **127**, 537–545. doi:10.1530/rep.1.00079
- Camargo LSA, Boite MC, Wohlfres-Viana S, Mota GB, Serapião RV, SáWF, Viana JHM, Nogueira LAG (2011) Osmotic challenge and expression of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. *Cryobiology* **63**, 256–262. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.09.135
- Daibert E, de Alvarenga PB, Rezende AL, Fagundes NS, Krüger BC, dos Santos RM, Mundim AV, Saut JPE (2018) Metabolites able to predict uterine diseases in crossbred dairy cows during the transition period. *Semina. Ciências Agrárias* **39**, 1037–1048. doi:10.5433/1679-0359.2018v39n3p1037

- Doepel L, Lapierre H, Kennelly JJ (2002) Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake. *Journal of Dairy Science* **85**, 2315–2334. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74312-9
- 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 (Cambridge, England)* **123**, 419–427. doi:10.1530/rep.0.1230419
- Grázia JGV, Silveira RO, Pereira ECM, Santos GCM (2016) Performance of dairy crossbred F1 donors (Gir · Holstein) in the production system in vitro embryo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **68**, 605–610.
- Hudson NL, Berg MC, Green MP, Back PJ, Thorstensen EB, Peterson AJ, Pitman JL, MacNatty KP (2014) The microenvironment of the ovarian follicle in the postpartum dairy cow: effects on reagent transfer from cumulus cells to oocytes in vitro. *Theriogenology* **82**, 563–573. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.05.016
- Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, Kruif A (2004) Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Animal Reproduction Science* **80**, 201–211. doi:10.1016/S0378-4320(03)00173-8
- Morrison DG, Spitzer JC, Perkins JL (1999) Perkins. Influence of prepartum body condition score change on reproduction in multiparous beef cows calving in moderate body condition. *Journal of Animal Science* **77**, 1048–1054. doi:10.2527/1999.7751048x
- Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR (2010) Associations of elevated nonesterified fatty acids and b-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science* **93**, 1596–1603. doi:10.3168/jds.2009-2852
- Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GMG, SanchesBV, Porcionato JPF, Vieira PHS, Faifer FS, Sterza FAM, Schenk JL, Seneda MM (2010) Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* **74**, 1349–1355. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.06.004

- Rabelo E, Rezende RL, Bertics SJ, Grummer RR (2005) Effects of preand postfresh transition diets varying in dietary energy density on metabolic status of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* **88**, 4375–4383. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73124-6
- Renaville B, Bacciu N, Comin A, Motta M, Poli I, Vanini G, Prandi A (2010) Plasma and follicular fluid fatty acid profiles in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* **45**, 118–121. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01264.x
- Sales JNS, Iguma LT, Batista RITP, Quintão CCR, Gama MAS, Freitas C, Pereira MM, Camargo LSA, Viana JHM, Souza JC, Baruselli PS (2015) Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Journal of Dairy Science* **98**, 3086–3099. doi:10.3168/jds.2014-8858
- Santos RM, Vasconcelos JLM (2006) Ingestão de concentrado e concentração plasmática de progesterona em vacas da raça Holandesa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **58**, 1162–1167. doi:10.1590/S0102-09352006000600027
- Sartori R, Guardieiro MM, Surjus RS, Melo LF, Prata AB, Ishiguro M, Bastos MR, Nascimento AB (2013) Metabolic hormones and reproductive function in cattle. *Animal Reproduction Science* **10**, 199–205.
- Sartori R, Gimenes LU, Monteiro PL, Melo LF, Baruselli PS, Bastos MR (2016) Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology* **86**, 32–40. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.016
- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C (2006) Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* **65**, 126–136. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.020
- Torres-Júnior JRS, Pires MFA, Sá WF, Ferreira AM, Viana JH, Camargo LS, Ramos AA, Folhadella IM, Polisseni J, Freitas C, Clemente CA, Sa Filho MF, Paula-Lopes FF, Baruselli PS (2008) Effect of maternal heatstress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* **69**, 155–166. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.06.023
- Van Hoeck V, Bols PEJ, Binelli M, Leroy JLMR (2014) Reduced oocyte and embryo quality in response to elevated non-esterified fatty acid concentrations: a possible

- pathway to subfertility? *Animal Reproduction Science* **149**, 19–29. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.07.015
- van Knegsel ATM, Rummelink GJ, Jorjongs S, Fievez V, Kemp B (2014) Effect of dry period length and dietary energy source on energy balance, milk yield, and milk composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science* **97**, 1499–1512. doi:10.3168/jds.2013-7391
- Viana JHM, Camargo LSA, Moraes FA, Sa WF, Carvalho FCA, Junior ADPM (2004) Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science* **84**, 1–12. doi:10.1016/j.anireprosci.2003.12.002
- Whitaker DA, Goodger WJ, Garcia M, Perera BMAO, Wittwer F (1999) Use of metabolic profiles in dairy cattle in tropical and subtropical countries on smallholder dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine* **38**, 119–131. doi:10.1016/S0167-5877(98)00118-4
- Wiltbank MC, Sartori R, Herlihy MM, Vasconcelos JLM, Nascimento AB, Souza AH, Ayres H, Cunha AB, Keskin A, Guenther JN, Gumen A (2011) Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology* **76**, 1568–1582. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.08.012
- Wittwer FG, Gallardo P, Reyes J, Opitz H (1999) Bulk milk urea concentrations and their relationship with cow fertility in grazing dairy herds in southern Chile. *Preventive Veterinary Medicine* **38**, 159–166. doi:10.1016/S0167-5877(98)00121-4

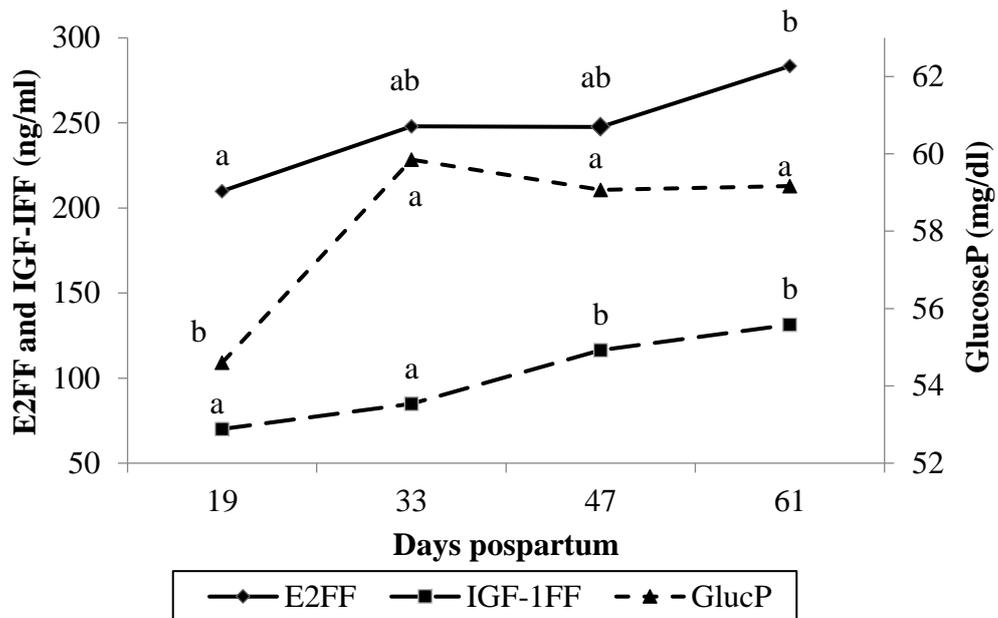


Fig. 1. Concentrations of oestradiol (E₂FF; ng/mL) and insulin-like growth factor I (IGF-1FF; ng/mL) in dominant-follicular fluid and plasmatic glucose (GlucP; mg/dL) during the early postpartum period of primiparous crossbred 3/4 and 7/8 Holstein × Gir (HG) dairy cows fed low- and high-energy diets.

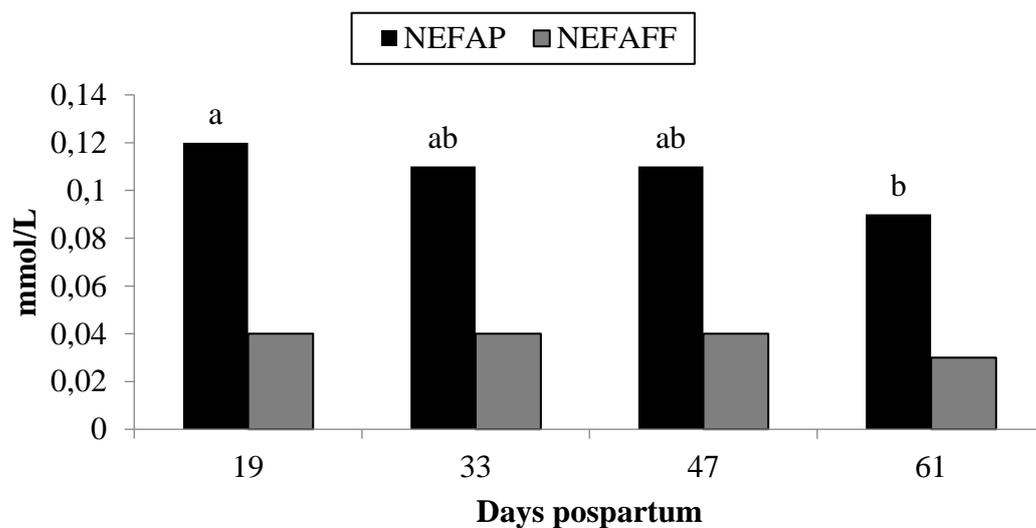


Fig. 2. Concentration of non-esterified fatty acid in follicular fluid and in plasma from crossbred primiparous cows (3/4 and 7/8 Holstein · Gir (HG)) fed low- and high-energy diets during the early postpartum period. NEFAP, plasma concentration of non-esterified fatty acid; NEFAFF, concentration of non-esterified fatty acid in follicular fluid.

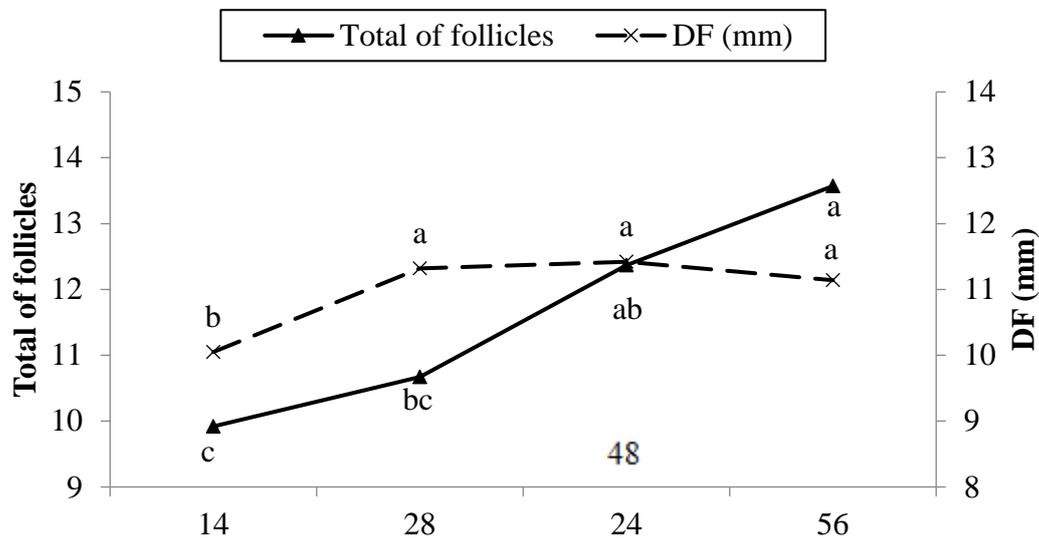


Fig. 3. Number of total follicles per cow and diameter of dominant follicle (DF) from crossbred primiparous cows (3/4 and 7/8 Holstein × Gir) fed low- and high-energy diets during the early postpartum period.

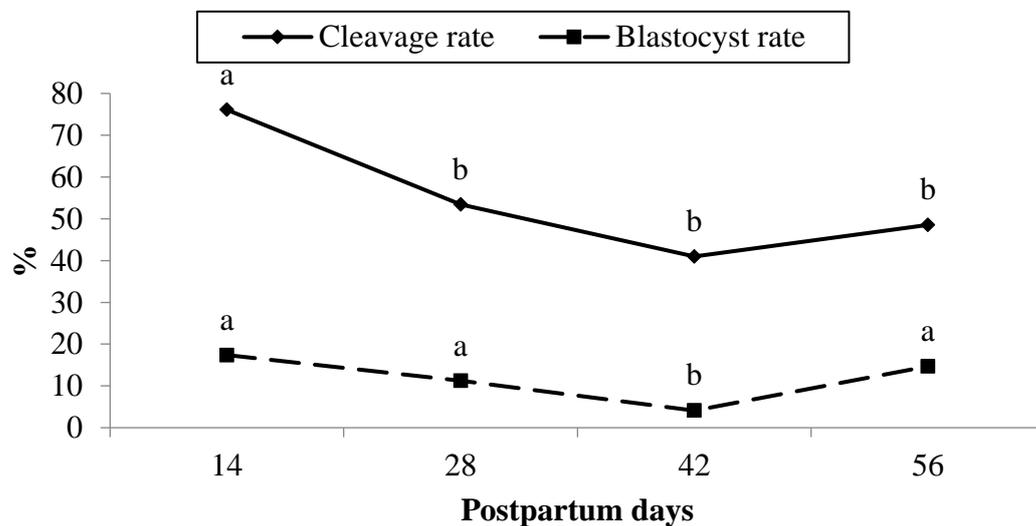


Fig. 4. Cleavage and blastocyst rate from crossbred primiparous cows (3/4 and 7/8 Holstein × Gir) fed low- and high-energy diets during the early postpartum period. Rates followed by different letters return significantly different qui-square test results (at $P = 0.05$).

Table 1. Composition of total diet provided to primiparous crossbred dairy cows during the early postpartum period

Diet composition (DM basis)	Energy diet	
	High energy (HE)	Low energy (LE)
Corn silage (%)	60.14	80.31
Soybean meal (%)	11.61	11.78
Ground corn (%)	25.08	4.68
Nucleus ^A (%)	2.10	2.14
Urea (%)	1.07	1.09
Dry matter (%)	33.16	27.43
Crude protein (kg/Kg deDM)	0.168	0.170
Neutral detergent fibre (%)	44	55
Calcium (g/kg)	7.2	7.4
Phosphorus (g/kg)	3.8	3.6
Net energy (Mcal/kg)	1.93	1.69

^AMineral and vitamin composition: calcium (190 g/kg), phosphorus (60 g/kg), sulfur (20 g/kg), magnesium (20 g/kg), potassium (35 g/kg), sodium (70 g/kg), cobalt (15 mg/kg), copper (700 mg/kg), chromium (10 mg/kg), iron (700 mg/kg), iodine (40 mg/kg), manganese (1600 mg/kg), selenium (19 mg/kg), zinc (2.500 mg/kg), fluorine (600 mg/kg), vitamin A (400 000 IU/kg), vitamin D3 (100 000 IU/kg), vitamin E (2.400 IU/kg).

Table 2. Effect of diet, genetic group, days postpartum and their interactions on metabolic and hormonal parameters in primiparous crossbred cows (3/4 and 7/8 Holstein × Gir) fed low- and high-energy diets during the early postpartum period

E₂FF, concentration of oestradiol in follicular fluid; P₄FF, concentration of progesterone in follicular fluid; E₂ : P₄, oestradiol : progesterone ratio; GlucP, plasma concentration of glucose; GlucFF, concentration of glucose in follicular fluid; InsP, plasma concentration of insulin; InsFF, concentration of insulin in follicular fluid; IGF-1FF, concentration of insulin-like growth factor-I in follicular fluid; UreaP, plasma concentration of urea; UreaFF, concentration of urea in follicular fluid; NEFAP, plasma concentration of non-esterified fatty acid; NEFAFF, concentration of non-esterified fatty acid in follicular fluid. GG, genetic group effect; DPP, days postpartum effect; GG × Diet, genetic group by diet interaction; Diet × DPP, diet by days postpartum interaction; GG × DPP, genetic group by days postpartum interaction. Significant ($P < 0.05$) P -values are in bold and indicate that the means differ; n.s., not significant

Parameter	Genetic group		Energy diet				P -value or significance						
	3/4 HG	7/8 HG	HE	LE	Mean	s.e.m.	Diet	GG	DPP	GG × Diet	Diet × DPP	GG × DPP	Diet × GG × DPP
GlucP (mg/dl)	59.39	56.95	59.77	56.58	58.31	0.57	0.0025	0.0194	0.0018	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
InsP (μUI/mL)	16.64	11.52	16.24	11.92	14.12	0.78	0.0394	0.0155	n.s.	0.0800	n.s.	n.s.	n.s.
UreaP (mg/dl)	30.16	25.80	27.44	28.52	28.19	0.73	n.s.	0.0458	0.0751	0.0156	n.s.	n.s.	n.s.
NEFAP (mmol/L)	0.11	0.10	0.09	0.13	0.11	0.006	0.0553	n.s.	0.0526	n.s.	n.s.	0.0789	n.s.
GlucFF (mg/dl)	59.21	58.51	60.57	57.18	58.15	0.87	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
InsFF (μUI/mL)	6.47	4.66	6.57	4.56	5.71	0.60	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IGF-1FF (ng/mL)	119.37	82.00	117.95	83.42	99.94	6.52	0.0392	0.0266	<0.0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
UreaFF (mg/dl)	26.49	23.65	26.57	23.57	27.17	1.37	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
NEFAFF (mmol/L)	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.003	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
E ₂ FF (ng/mL)	264.77	229.75	242.62	251.91	246.16	10.31	n.s.	n.s.	0.0494	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
P ₄ FF (ng/mL)	51.13	61.74	52.20	60.67	55.53	3.18	n.s.	n.s.	0.0564	0.0903	n.s.	n.s.	n.s.
E ₂ : P ₄	6.06	4.15	4.96	5.25	5.10	0.29	n.s.	0.0037	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Table 3. Number of total and viable oocytes recovered from crossbred primiparous cows (3/4 and 7/8 Holstein × Gir) fed low- and high-energy diet during the early postpartum period

Means followed by different upper-case letters differ by Tukey test (at $P = 0.05$) when comparing genetic groups. Percentage values followed by different lower-case letters differ by chi-square test (at $P = 0.05$)

Variable	Energy diet	Genetic group		Mean
		3/4 Holstein × Gir	7/8 Holstein × Gir	
Total oocytes (n) ($n = 689$)	High	6.91 ± 1.70	3.07 ± 1.81	4.99 ± 1.24
	Low	10.18 ± 1.81	4.04 ± 1.96	7.11 ± 1.34
	Total	8.54 ± 1.24X	3.56 ± 1.33Y	6.15 ± 0.58
Viable oocytes (n) ($n = 517$)	High	5.06 ± 1.44	2.39 ± 1.54	3.73 ± 1.06
	Low	8.11 ± 1.54	2.54 ± 1.67	5.32 ± 1.14
	Total	6.58 ± 1.06X	2.47 ± 1.14Y	4.62 ± 0.48
Viable oocytes (%)	High	73.30a (162/221)	77.90a (67/86)	74.59 (229/307)
	Low	79.65a (227/285)	62.89b (61/97)	75.39 (288/382)
	Total	76.87 (389/506)	69.94 (128/183)	75.03 (517/689)

Table 4. Cleavage and blastocyst rates during the first 56 days postpartum in crossbred (3/4 and 7/8 Holstein × Gir (HG)) cows fed high- and low-energy diets

Rates in the same column followed by different letters differ significantly (chi-square test, at $P = 0.05$)

Cow genetic group	Energy diet	Cleavage rate (%)	Blastocyst rate (%)	Blastocyst rate/cleavage oocyte
3/4 HG	High	54.93b (89/162)	14.81 (24/162)	26.97X (24/89)
	Low	32.60c (74/227)	9.70 (22/227)	28.57X (22/74)
7/8 HG	High	97.01a (65/67)	7.50 (5/67)	7.00Y (5/65)
	Low	90.16a (55/61)	18.03 (11/61)	20.00X (11/55)

8 ANEXOS

Anexo 1: PROTOCOLO CEUA-EGL Nº: 03/2012



Protocolo nº: 03/2012

A Comissão de Ética No Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite **APROVOU** os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo, referente ao projeto/experimento:

“Balanço energético e atividade ovariana de vacas mestiças leiteiras a pasto.”



.....
Presidente/Secretário da CEUA-EGL

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco – 36038-330 Juiz de Fora/MG
Telefone: (32) 3311-7402 Fax: (32) 3311-
ceua@cnppl.embrapa.br

Anexo 2: PROTOCOLO CEUA-EGL Nº: 21/2014



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Eficiência alimentar de bovinos leiteiros na fase de recria: Efeito do aleitamento intensivo sobre o desempenho, saúde e puberdade de novilhas mestiças Holandes-GIR**", Protocolo Nº **21/2014**, sob a responsabilidade de **Fernanda Samarini Machado** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite, em reunião de **20/08/14**.

Vigência do Projeto	De 10/09/2014 a 12/11/2015
Espécie/Linhagem	<i>Bos taurus</i> /Bovino Hol-Gir
Nº de Animais	60
Peso/Idade	≅ 90 a 300Kg/3 a 12 meses
Sexo	Machos () Fêmeas (x)
Origem	Biotérios da Embrapa Gado de Leite (x) Frigorífico ()

João Batista Ribeiro
Secretário Administrativo da CEUA/EGL

Embrapa Gado de Leite

Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco – 36038-330 Juiz de Fora/MG
Telefone: (32) 3311-7405 Fax: (32) 3311-7401 cnpgl.ceua@cnpgl.embrapa.br