

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

INFUSÃO INTRAVENOSA DE GLICOSE E BALANÇO
ENERGÉTICO NA EXPRESSÃO DE ENZIMAS HEPÁTICAS
RESPONSÁVEIS PELO CATABOLISMO DE PROGESTERONA
EM BOVINOS

FERNANDA VICTOR RODRIGUES VIEIRA

Dissertação apresentada
ao Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia
como parte das exigências
para obtenção do título de
Mestre

BOTUCATU – SP
Fevereiro – 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

INFUSÃO INTRAVENOSA DE GLICOSE E BALANÇO
ENERGÉTICO NA EXPRESSÃO DE ENZIMAS HEPÁTICAS
RESPONSÁVEIS PELO CATABOLISMO DE PROGESTERONA
EM BOVINOS

FERNANDA VICTOR RODRIGUES VIEIRA
Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Ass. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos

Dissertação apresentada
ao Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia
como parte das exigências
para obtenção do título de
Mestre

BOTUCATU – SP
Fevereiro – 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Vieira, Fernanda Victor Rodrigues, 1984-
V658i Infusão intravenosa de glicose e balanço energético na expressão de enzimas hepáticas responsáveis pelo catabolismo de progesterona em bovinos / Fernanda Victor Rodrigues Vieira. - Botucatu : [s.n.], 2012
iv, 54 f. : il. (algumas color.), gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2012

Orientador: José Luiz Moraes Vasconcelos
Inclui bibliografia

1. Vacas. 2. Insulina. 3. Glicose. 4. Balanço energético. 5. Enzimas hepáticas. 6. Citocromo P450 2C. 7. Citocromo P450 3A. I. Vasconcelos, José Luiz Moraes. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

Dedico bons projetos e resultados aos meus queridos pais, Ana e Roberto, que me ensinam a ver a vida de maneira clara e boa, do jeito que ela é, nem mais, nem menos.

Sempre esforçaram-se ao máximo para oferecer o melhor; sempre conseguiram.

Não sei se sou o exemplo de filha e pessoa que eles queriam que eu fosse, mas, com certeza, fizeram de tudo para que isso acontecesse.

Amor incondicional, carinho e respeito são qualidades que fazem, ou pelo menos deveriam fazer parte de todos os pais, sem dúvidas, eles as possuem e vão muito além.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Minha alegria e reconhecimento não seriam suficientes para agradecer a colaboração dos que se seguem:

Ao querido professor Zequinha, pelo exemplo de orientação, pode ser que existam orientadores tão bons, objetivos, claros e eficientes quanto ele, porém não conheço nenhum.

Ao professor Reinaldo Cooke, pela incansável ajuda sempre que precisei. Por suas explicações, paciência e entusiasmo em ensinar.

Ao professor José Buratini Júnior, por abrir as portas do Laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana do Instituto de Biociências/UNESP/Botucatu e por sua disposição em ajudar no que fosse necessário.

À Paula, por sua disposição invejável, alegria e enorme ajuda nos testes de PCR.

Aos professores Heraldo César Gonçalves e José Buratini Júnior por participarem da banca do Exame Geral de Qualificação e pela excelente contribuição.

Aos professores José Buratini Júnior e Roberto Sartori Filho por participarem da banca de Defesa e pela ajuda no crescimento e melhora desse trabalho.

Às vacas 01, 02, 04, 05, 06, 07, 13, 14, 15, 309, 314, Rebeca, Rebelde, Recordista e Oreia. De alguma maneira, nosso débito com os outros animais é enorme.

Aos laboratórios e técnicos responsáveis pelas análises de glicose, insulina, IGF-1, progesterona e expressão de RNAm.

Aos amigos de pós-graduação Augusto, Adnan, Carlos, Everton, Fernando, Lucas, Marcos e Thiago, pelos momentos vividos e lições aprendidas.

Agradecimento em especial ao amigo Augusto pelo convívio desde 2005. A condução deste experimento não seria possível sem muitas pessoas aqui citadas, ele, sem dúvidas, é uma delas.

Ao amigo de graduação Bruno, pela amizade e ajuda nessa dissertação.

Ao Desidério, funcionário do setor de Bovinocultura de Leite, por sua disposição em ajudar, discutir e, efetivamente, fazer parte dos experimentos conduzidos no setor.

Ao professor André Mendes Jorge, por disponibilizar as instalações do setor de Bubalinocultura e aos funcionários do mesmo setor, Lipe e Liu, sempre dispostos a ajudar.

À comunidade da FMVZ, principalmente aos queridos Barbosa, Carlos, Carmen, Professora Margarida, Renato, Seila, Solange e Marta.

À Fapesp, pelo apoio financeiro.

À Conapec, por seu exemplo de união e trabalho.

A todos que se seguem pela ajuda durante todo o experimento, sem eles, a parte experimental desse projeto não seria possível: Rapariga, Jamanta, Du Mato, Caipora, Juízo, Clodovil, Xega, Crispim, Alce, Adnan, Barichelo, Almôndega, Atoladinha, Mc, Podecrê, Safada, Paulo, Prepúcio, Xaverin, Mamão Jr, Retirero, Tia Benê, Giromba, Shirlei, Xuasneguer, Abeia, Mundiça, Catarina, Heni e Michele.

A minha querida família: Ana, Roberto, Ronan, Anna, Leia, Raul, Pitu, Gabi, Bibi e Zeca, por serem inspiração de amor e darem-me força para sempre continuar.

Ao querido amigo e companheiro Fábio, por sempre me ensinar e mostrar o lado bom de tudo.

Aos amigos que aqui fiz e que me ajudaram a crescer: Aline, Érica, Edson, Graciela, Lara, Raquel, Simone.

Agradeço a *Deus* pela vida e pelas oportunidades fornecidas. Muito obrigada!

"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta."

Chico Xavier

“Não há diferenças fundamentais entre o homem e os animais, nas suas faculdades mentais... os animais, como os homens, demonstram sentir prazer, dor, felicidade e sofrimento.”

Charles Darwin

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iii
CAPÍTULO 1.....	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Escore de Condição Corporal e eficiência na reprodução	3
2.2. Balanço energético, hormônios e metabólitos	3
2.3. Infusão de glicose e secreção de insulina.....	5
2.4. Catabolismo de progesterona e ingestão de matéria seca	6
2.5. Família citocromo P450 e metabolismo de progesterona	7
2.6. Regulação dos citocromos P450s pela insulina	9
3. Referências Bibliográficas	11
CAPÍTULO 2.....	19
INFUSÃO INTRAVENOSA DE GLICOSE E BALANÇO ENERGÉTICO NA EXPRESSÃO DE ENZIMAS HEPÁTICAS RESPONSÁVEIS PELO CATABOLISMO DE PROGESTERONA EM BOVINOS	19
RESUMO.....	20
ABSTRACT	22
1. Introdução	23
2. Material e Métodos	25
2.1. Animais e dietas	25
2.2. Dispositivo intravaginal de progesterona	26
2.3. Infusão de glicose e colheitas de sangue	26
2.4. Biopsias hepáticas.....	27
2.5. Investigação da expressão do RNAm.....	28
2.6. Dosagens	30

2.7. Métodos Estatísticos	30
3. Resultados	31
4. Discussão.....	37
5. Conclusões.....	42
6. Referências Bibliográficas	43
CAPÍTULO 3.....	53
Conclusões Gerais e Implicações.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AGNEs – Ácidos Graxos Não Esterificados

AKR – Aldo keto redutase

BE – Balanço Energético

BEN – Balanço Energético Negativo

BEP – Balanço Energético Positivo

CIDR – Dispositivo intravaginal de progesterona

CYP2C – Citocromo P450 2C

CYP3A- Citocromo P450 3A

ECC – Escore de Condição Corporal

GH – Hormônio de crescimento

GHR1A – Receptor de GH 1A

GHR – Receptor de GH

GRF – Fator de liberação de GH

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina

IMS – Ingestão de Matéria Seca

LH – Hormônio Luteinizante

MS – Matéria Seca

P4 - Progesterona

PV – Peso Vivo

RT-PCR – Transcrição reversa

RNA_m – RNA mensageiro

PCR – Reação Polimerásica em Cadeia

PPG – Propilenoglicol

T°C – Temperatura em graus Celsius

UGT – Uridina difosfato glucuronosiltransferase

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1

FIGURA 1.....	04
Interação entre hipoinsulinemia e o eixo GH – IGF-1. Adaptado de Butler et al. (2003a)	

FIGURA 2.....	09
Esquema geral da inativação da progesterona nos hepatócitos. Fonte: Lemley & Wilson (2010)	

CAPÍTULO 2

FIGURA 1.....	26
Esquema de disposição de CIDR e colheitas de sangue	

FIGURA 2.....	32
Concentrações séricas de glicose (mg/dL) em vacas não lactantes infundidas via intravenosa com solução de glicose a 5% (Glicose; 0,5g/kg de PV; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas) ou com solução fisiológica (Salina; 0,9% NaCl; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas)	

FIGURA 3.....	33
Concentrações séricas de insulina (μ IU/mL) em vacas não lactantes infundidas via intravenosa com solução de glicose a 5% (Glicose; 0,5g/kg de PV; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas) ou com solução fisiológica (Salina; 0,9% NaCl; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas)	

FIGURA 4.....	35
Concentrações séricas de IGF-1 (ng/mL) em vacas não lactantes infundidas via intravenosa com solução de glicose a 5% (Glicose; 0,5g/kg de PV; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas) ou com solução fisiológica (Salina; 0,9% NaCl; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas)	

LISTA DE TABELAS

Página

CAPITULO 2

TABELA 1.....	29
Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para os genes alvo (CYP2C, CYP3A, GHR1A e IGF-1) e endógenos (β -actina, CYC-A, GAPDH e RPS9), temperatura em graus Celsius (T°C) de anelamento, eficiência e referência bibliográfica	
TABELA 2.....	31
Mudanças no PV e ECC do d -28 ao d 0 do experimento e concentrações séricas de glicose, insulina, IGF-1 e P4 no início do jejum (12 horas antes da infusão dos tratamentos) de vacas ovariectomizadas e secas em BEN ou BEP	
TABELA 3.....	34
Expressão de RNAm de CYP2C, CYP3A, GHR1A e IGF-1 às 0h de vacas ovariectomizadas e secas em BEN ou BEP	
TABELA 4.....	34
Expressão de RNAm de GHR1A às 3 horas pós-infusão em vacas não lactantes infundidas via intravenosa com solução de glicose a 5% (Glicose; 0,5g/kg de PV; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas) ou com solução fisiológica (Salina; 0,9% NaCl; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas)	
TABELA 5.....	36
Expressão de RNAm de CYP3A às 3 horas pós-infusão em vacas não lactantes infundidas via intravenosa com solução de glicose a 5% (Glicose; 0,5g/kg de PV; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas) ou com solução fisiológica (Salina; 0,9% NaCl; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas)	

TABELA 6.....36

Concentração sérica média de P4 (ng/mL) pós-infusão em vacas não lactantes infundidas via intravenosa com solução de glicose a 5% (Glicose; 0,5g/kg de PV; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas) ou com solução fisiológica (Salina; 0,9% NaCl; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas)

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

Várias pesquisas têm relatado a importância do estado nutricional em relação ao desempenho reprodutivo em vacas leiteiras (VAN KNEGSEL et al, 2005; ROCHE, 2006; GARNSWORTHY et al, 2008a). Neste sentido, ingestão de energia é associada ao reinício da sinalização endócrina normal na vaca pós-parto e a maiores taxas de prenhez (WILTBANK et al., 1962; SCHILLO et al., 1992), o que tem sido associado a dietas de alta energia que promovem secreção de insulina (CHAGAS et al., 2007). Hidalgo et al. (2004) observaram que energia adicionada na forma de propilenoglicol (PPG) uma vez por dia foi associada ao aumento nas concentrações séricas de insulina, progesterona (P4) e taxa de prenhez em vacas leiteiras (HIDALGO et al., 2004).

Além disto, a insulina pode afetar a reprodução em bovinos modulando a expressão de enzimas hepáticas associadas ao catabolismo de P4, tais como citocromo P450 2C (CYP2C) e citocromo P450 3A (CYP3A) (MURRAY, 1991; LEMLEY et al., 2008a). Baixas concentrações séricas de P4, devido à elevada taxa de catabolismo e/ou deficiências na função luteal, podem ser responsáveis pelo aumento das perdas de prenhez (LEMLEY et al., 2008a).

Trabalhos preliminares relataram que vacas leiteiras e vacas de corte com maiores concentrações séricas de insulina tiveram maiores concentrações séricas de P4 comparadas às vacas com menores concentrações séricas de insulina (MORIEL et al., 2008; LOPES et al., 2009), porém estes estudos avaliaram vacas em moderado balanço energético positivo (BEP). Sabe-se que o metabolismo de insulina é dependente do estado nutricional, e sua síntese, liberação e efeitos metabólicos diferem em bovinos em BEN (HOVE et al., 1978; VEERKAMP et al., 2003).

Vieira et al. (2010), estudando vacas ovariectomizadas, secas e com CIDR, recebendo infusão intravenosa de glicose em diferentes BE, demonstraram que houve aumento nas concentrações séricas de glicose e insulina para vacas em BEN e BEP, porém houve aumento nas concentrações séricas de P4 apenas para vacas em BEP, provavelmente devido ao aumento nas concentrações séricas de insulina e à diminuição da atividade das enzimas responsáveis pela metabolização da P4 no fígado (MURRAY, 1991; LEMLEY et al., 2008a).

Há poucos estudos avaliando as concentrações séricas de P4 diretamente relacionadas às concentrações séricas de insulina e expressão de CYP2C e CYP3A. Estes mecanismos fisiológicos são importantes e necessitam maiores investigações,

uma vez que insulina e P4 séricas estão associadas à função reprodutiva em vacas leiteiras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Escore de Condição Corporal e eficiência na reprodução

O início da lactação está associado a período prolongado de BEN, durante o qual o consumo de energia é inferior às exigências energéticas envolvidas no rápido aumento da produção de leite (Butler et al., 2003a). Este processo metabólico e endócrino resulta em mudanças que afetam negativamente a fertilidade (VEERKAMP et al., 2003; BUTLER et al., 2004).

Butler (2005) verificou que a taxa de concepção diminuiu em 10% para cada perda de 0,5 unidade de Escore de Condição Corporal (ECC) e Pescara et al. (2009) observaram que vacas com menor ECC ($< 5,0$) apresentaram menor concentração sérica de P4, menor taxa de concepção e maior perda embrionária quando comparadas com vacas com maior ECC ($\geq 5,0$). Beal et al. (1978) observaram que as concentrações séricas de P4 diminuíram em bovinos com restrição energética comparados a bovinos consumindo adequadas quantidades de energia. P4 é um hormônio necessário para retomada e estabelecimento dos ciclos estrais e manutenção da prenhez (SPENCER & BAZER, 2002;. LOOPER et al, 2003).

Estes dados em conjunto sugerem que vacas em restrição energética, com maior perda de condição corporal, maiores concentrações séricas de ácidos graxos não esterificados (AGNEs), menores concentrações séricas de glicose e insulina podem ter menores concentrações séricas de P4, o que compromete o desempenho reprodutivo.

2.2. Balanço energético, hormônios e metabólitos

Hormônios metabólicos influenciam a fertilidade de vacas leiteiras interagindo com hormônios reprodutivos que controlam a função ovariana e eventos reprodutivos (WEBB et al., 2004; GARNSWORTHY et al., 2008b).

Concentrações séricas de glicose são afetadas pelo ECC (ADAMS et al., 1987) e podem influenciar o desempenho reprodutivo em bovinos (VIZCARRA et al., 1998). As

concentrações séricas de glicose e insulina são influenciadas positivamente pela taxa de ingestão de nutrientes (VIZCARRA et al., 1998).

Vacas leiteiras em restrição alimentar e, conseqüentemente em BEN, têm diminuição nas concentrações séricas de glicose (BUTLER et al. 2003b) e insulina (SANGSRITAVONG et al., 2002; BUTLER et al. 2003a; BUTLER, 2005) e aumento nas concentrações de GH (BUTLER et al. 2003a). Mudanças nas concentrações séricas de GH durante este período são opostas às concentrações séricas de IGF-1 e insulina (BELL et al., 2000). Em adição, aumento nas concentrações séricas de IGF-1, devido à boa condição nutricional, geralmente é acompanhado por aumento nas concentrações séricas de glicose e insulina (BOSSIS et al., 2000).

Vacas em BEN têm como característica, concentrações séricas de AGNEs aumentadas (BOSSIS et al. 1999; MACKEY et al., 2000). Butler et al. (2003a) observaram que durante situações de baixas concentrações séricas de insulina, incluindo períodos de BEN, a expressão hepática de receptor de GH (GHR) e RNAm de IGF-1 está reduzida, resultando em diminuição na concentração sérica de IGF-1 e aumento na concentração sérica de GH. No tecido adiposo, a expressão de GHR é aumentada durante a hipoinsulinemia, resultando em aumento da mobilização do tecido adiposo (Figura 1). Os receptores de GH são encontrados em muitos tecidos, sendo o fígado o lugar de maior abundância (LUCY et al., 1998). O RNAm de GHR1A é expresso exclusivamente em fígado bovino adulto (LUCY et al., 1998), é a maior das três variantes (GHR1A, GHR1B e GHR1C) de GHR, que normalmente representa 50% do total de mRNA GHR no fígado de bovinos (JIANG & LUCY 2001).

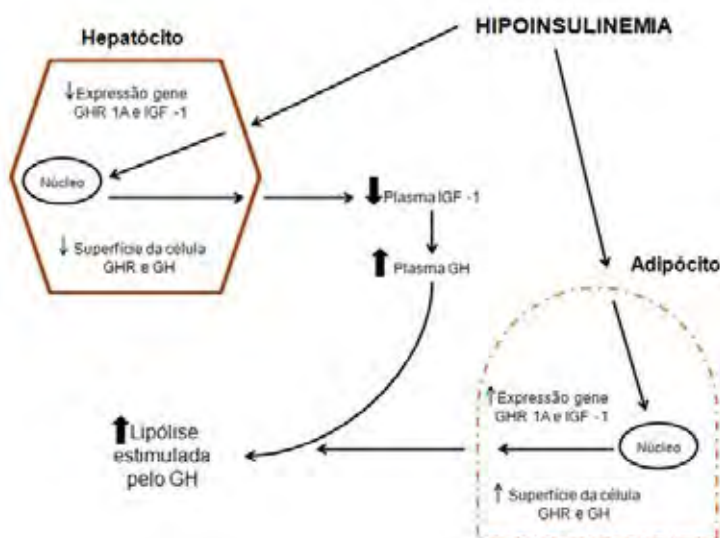


Figura 1. Interação entre hipoinsulinemia e o eixo GH – IGF-1. Adaptado de **Butler et al. (2003a)**

A hipoinsulinemia faz parte das mudanças que ocorrem em torno do parto para que a lactação seja priorizada (BUTLER et al., 2003a). Baixos níveis séricos de insulina reduzem a absorção de glicose nos tecidos periféricos responsivos a este hormônio (adiposo e muscular) e facilitam maior captação de glicose pela glândula mamária (BAUMAN & ELLIOT, 1983), um tecido que não é insulino-responsivo. Assim, não é surpreendente que os avanços genéticos para produção de leite resultaram em baixos níveis séricos de insulina em vacas da raça Holandesa (BONCZEK et al. 1988).

A restrição alimentar e BEN reduzem as concentrações séricas de insulina, (MACKEY et al., 2000; SINCLAIR et al., 2002), estes fatores estão associados à diminuição da pulsatilidade da secreção de LH, reduzida responsividade do ovário ao LH e reduzida secreção de estradiol pelo folículo dominante, efeitos que comprometem a ovulação do folículo dominante (BUTLER, 2003b).

Vacas submetidas à dieta que induziu elevadas concentrações séricas de insulina ovularam mais cedo (GONG et al., 2002). Por outro lado, elevadas concentrações séricas de insulina tiveram impacto negativo sobre a qualidade e desenvolvimento de oócitos e embriões (ARMSTRONG et al., 2003; FOULADI-NASHTA et al., 2005).

2.3. Infusão de glicose e secreção de insulina

A glicose é o principal regulador fisiológico de insulina nos mamíferos (PHILIPPE, 1991). Níveis séricos altos de glicose provocam secreção de insulina pelas células β do pâncreas; níveis baixos deprimem essa secreção e aumentam a secreção de glucagon pelas células α do pâncreas (BERG, 2008).

Apesar dos fatores que influenciam a liberação de insulina em vacas continuarem pouco documentados (BOSSAERT, et al., 2008), e também ser secretada em resposta a hormônios gastrointestinais e a mecanismos neurais/parácrinos associados com ingestão de alimentos, ela é principalmente secretada em resposta à concentração sérica de glicose (NUSSEY & WHITEHEAD, 2001).

Segundo Fraser (1991), os valores de glicose no sangue de vacas, na faixa de variação considerada normal, estão entre 42 e 74 mg/dL. A concentração sérica de glicose em bovinos é dependente da gliconeogênese hepática, oriunda dos ingredientes da dieta, sendo este mecanismo o responsável por grande parte da glicose circulante (YOUNG, 1977; ARMENTANO, 1992).

Entretanto, bovinos em inadequado estado nutricional devem usar outros substratos, tais como aminoácidos endógenos e glicerol vindo de triacilglicerídeos,

para, via gliconeogênese, compensar as deficiências nutricionais e prevenir reduções significativas na circulação de glicose, dado que a glicose é essencial para a manutenção e diversas funções produtivas nos ruminantes (HUNTINGTON, 1997). Assim, o metabolismo de insulina é altamente dependente do estado nutricional, e sua síntese, liberação e efeitos metabólicos diferem em bovinos em BEN, tais como vacas leiteiras no periparto quando comparadas com vacas em BEP (HOVE, 1978; VEERKAMP et al., 2003).

Em condições de hiperglicemia, como infusão intravenosa de glicose, a taxa de secreção de insulina pancreática aumenta, assim como a taxa de remoção e armazenamento de glicose do sangue (SMITH et al., 2009). O suprimento de glicose exógena através de infusão intravenosa ou intraduodenal diminui a síntese de glicose endógena (BARTLEY & BLACK, 1966; LENG, 1970). Para vacas em BEP, maior disponibilidade de glicose aumenta o BE dos tecidos e a oxidação de glicose (REYNOLDS et al., 1994).

Hove (1978), após infusão de glicose em vacas em lactação com adequada ou inadequada ingestão de nutrientes, observou comportamento bifásico na curva de insulina para vacas em adequado BE, sendo o primeiro e maior pico caracterizado por maiores concentrações séricas de insulina e mais rápida queda e o segundo pico por menores concentrações séricas de insulina, porém sendo mantidas em níveis mais elevados durante mais tempo, e apenas um pico para vacas em inadequado BE, sugerindo que estas diferenças podem ser atribuídas à alteração de reservas de pró-insulina nas células β do pâncreas devido ao estado nutricional (NELSON & COX, 2005). Vieira et al. (2010) observaram o mesmo padrão na curva de liberação de insulina, sendo bifásico para vacas em BEP e apenas um pico para vacas em BEN, porém estes resultados ainda não são suficientes para elucidar este mecanismo em bovinos, sendo necessária a realização de mais pesquisas para esclarecer este assunto.

2.4. Catabolismo de progesterona e ingestão de matéria seca

Elevadas taxas de catabolismo, deficiências na função luteal ou ambos devem ser responsáveis por menores concentrações séricas de P4 e pelo aumento das perdas de prenhez em vacas leiteiras (LEMLEY et al., 2008a; RHINEHART et al., 2009).

Alguns estudos mostraram relação positiva entre a taxa de catabolismo de P4 e fluxo sanguíneo no fígado de ovelhas e vacas leiteiras (PARR et al, 1993; SANGSRITAVONG et al, 2002).

Harrison et al. (1990) observaram correlação entre Ingestão de Matéria Seca (IMS) e produção de leite, sendo alta IMS uma característica da vaca leiteira de alta produção em lactação (SANGSRITAVONG et al., 2002). Diversos estudos têm relatado os efeitos prejudiciais da IMS nas concentrações de P4 (PARR et al., 1987; DUNNE et al., 1999; SANGSRITAVONG et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003). Neste mesmo sentido, alguns estudos mostraram que aumento na ingestão de IMS provoca maior fluxo sanguíneo na veia porta hepática (SYMONDS & PRIME, 1989) e aumenta o catabolismo de P4 (PRIME & SYMONDS, 1993; PARR et al., 1993; MILLER et al., 1999; VASCONCELOS et al., 2003).

Sangsrivong et al. (2002), utilizando vacas leiteiras, observaram aumento no fluxo sanguíneo no fígado e na taxa de catabolismo de P4 pelas células hepáticas, resultando em diminuição nas concentrações séricas de P4 após a alimentação (SANGSRITAVONG et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003).

Uma quantidade considerável de P4 é catabolizada nos rins, cérebro, ovário e adrenal (BEDFORD et al, 1974; PARR et al, 1993), porém, dado que o fígado é o maior local de catabolismo de P4 (PARR et al., 1993; FREETLY & FERRELL, 1994), o aumento na IMS aumentaria o catabolismo destes esteróides devido à elevação no fluxo sanguíneo no fígado (SANGSRITAVONG et al., 2002).

A diminuição nas concentrações séricas de P4 devido ao catabolismo de esteróides elevado pode ser parcialmente responsável pela redução da fertilidade (LUCY, 2001; WASHBURN et al, 2002) e aumento de perda da gestação (VASCONCELOS et al, 1997) em vacas lactantes.

2.5. Família citocromo P450 e metabolismo de progesterona

Os citocromos P450s estão presentes na maioria dos tecidos, mas são altamente expressos nos hepatócitos (as enzimas P450s representam de 1 a 2% do peso dos hepatócitos) e estão tipicamente no retículo endoplasmático liso (RUCKPAUL & REIN, 1984).

O catabolismo de P4 ocorre principalmente no fígado via subfamília CYP2C e CYP3A. Os citocromos P450s estão envolvidos no metabolismo de inúmeros compostos endógenos, incluindo a ativação da vitamina D3, o catabolismo de

colesterol em ácidos biliares e o metabolismo de todas as principais classes de hormônios esteróides (WAXMAN et al., 1991).

A P4 é inativada no fígado em duas fases: na primeira, há a adição de grupos hidroxil ao núcleo do esteróide, produzindo o metabólito 21-hidroxiprogesterona ou 6 β -hidroxiprogesterona via CYP2C ou CYP3A, respectivamente (MURRAY et al., 1991, 1992). Ainda na primeira fase, a subfamília aldo keto redutase (AKR) 1C converte P4 em 3 α -hidroxiprogesterona ou 20 α -hidroxiprogesterona em humanos e roedores (PENNING et al., 2000). As enzimas AKR também estão envolvidas na redução da glicose, metabolismo das prostaglandinas, geração de ácidos biliares e redução de esteróides contendo grupos aldeído ou cetona (PENNING et al, 2000; BARSKI et al, 2008;. KABUTUTU et al., 2009). Já na segunda fase, as enzimas uridina difosfato glucuronosiltransferase (UGT) 1A e 1B conjugam o metabólito hidroxiprogesterona com o ácido glicurônico (BOWALGAHA et al., 2007) (Figura 2).

Waxman et al. (1991) determinaram os citocromos P450s predominantes em humanos que catabolizam androstenediona, estradiol, P4 e testosterona. A P4 foi predominantemente catabolizada em 6 β -hidroxiprogesterona e 16 α -hidroxiprogesterona por CYP3A4, CYP3A3, CYP4B1, CYP3A5 e CYP2C8, em ordem de maior para menor atividade. You (2004) observou que as enzimas CYP2C e CYP3A são responsáveis por converter P4 em hidroxiprogesterona. Dean & Stock (1975) sugeriram que a diminuição na atividade total dos citocromos P450 no fígado, elevaria as concentrações séricas de P4. Em suínos, o catabolismo de P4 não parece associado ao conteúdo de CYP no fígado depois de alterar o consumo de ração. No entanto, o conteúdo total de CYP foi positivamente correlacionado com a taxa de inativação de P4 “in vitro” (MILLER et al, 1999). Murray (1991; 1992) mostrou que as principais isoenzimas envolvidas no catabolismo de P4 em ovinos pertencem à subfamília CYP2C e 3A e os principais metabólitos que foram achados foram a 21-hidroxiprogesterona e a 6 β -hidroxiprogesterona.

Lemley & Wilson (2010) concluíram que as enzimas CYP2C, AKR1C e CYP3A são as que mais contribuem para a inativação hepática de P4 em vacas em lactação em ordem de maior para menor atividade, sendo necessárias mais pesquisas para elucidar as específicas isoenzimas e seus mecanismos durante vários estados fisiológicos “in vivo”.

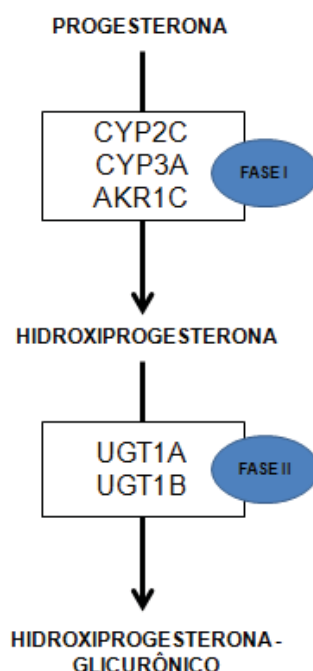


Figura 2. Esquema geral da inativação da progesterona nos hepatócitos. Fonte: **Lemley & Wilson (2010)**

2.6. Regulação dos citocromos P450s pela insulina

A relação entre a expressão dos citocromos P450 e insulina foi proposta quando Barnett et al. (1990) e Shimojo et al. (1993) observaram aumento na expressão da enzima CYP3A em ratos diabéticos insulino-dependentes (concentrações baixas de insulina), que foi revertido pela reposição de insulina.

Moriel et al. (2008) e Lopes et al. (2009) estudando vacas ovariectomizadas e secas, com dispositivo intravaginal de P4 (CIDR), observaram que vacas com maior concentração sérica de insulina apresentavam maiores concentrações séricas médias de P4 quando comparadas a vacas com menor insulina, sugerindo que a insulina pode modular a concentração sérica de P4 pelo efeito inibitório no catabolismo hepático deste hormônio em bovinos. Murray (1991) e Lemley et al. (2008a) observaram que insulina alterou a expressão das enzimas catabólicas CYP2C e CYP3A, sugerindo redução no catabolismo hepático de P4.

Saad et al. (1994) encontraram uma redução de 40% na formação de 6 β -hidroxitestosterona, produto metabólico primariamente catabolizado pela subfamília CYP3A, em hepatócitos de ratos expostos a 10 nM de insulina versus 1 nM. Smith et

al. (2006) relataram diminuição na taxa fracional constante de catabolismo de P4 em células hepáticas de ratos desafiados com aumento nas concentrações fisiológicas de insulina. Lemley et al. (2009), utilizando o mesmo tipo de célula e as mesmas condições experimentais, relataram diminuição na atividade de CYP2C e CYP3A depois de desafiar hepatócitos com aumento das concentrações fisiológicas de insulina. Semelhante aos dados “in vitro”, Smith et al. (2006) observaram diminuição no catabolismo de P4 em ovelhas oralmente tratadas com propionato de sódio versus acetato de sódio. Lemley et al. (2008b) encontraram diminuição de aproximadamente 50% na atividade de CYP2C e CYP3A, uma hora pós-alimentação em ovelhas ovariectomizadas suplementadas com propionato de sódio em relação as suplementadas com acetato de sódio.

Apesar de existirem trabalhos sobre baixa concentração sérica de P4 e baixa fertilidade em vacas leiteiras, ainda existem poucos trabalhos sobre a importância das enzimas CYP2C e 3A “in vivo” no catabolismo de P4. Portanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar os efeitos da insulina sobre as concentrações séricas de P4 “in vivo”. Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da infusão intravenosa de glicose sobre as concentrações séricas de glicose, insulina, IGF-1, P4, expressão de RNAm de GHR1A e IGF-1, e expressão de RNAm das enzimas hepáticas CYP2C e CYP3A, responsáveis pelo catabolismo de P4 no fígado, em vacas leiteiras secas, ovariectomizadas e com dispositivo intravaginal de P4 (CIDR) em diferentes BE.

No capítulo 2, é apresentado o trabalho “Infusão intravenosa de glicose e balanço energético na expressão de enzimas hepáticas responsáveis pelo catabolismo de progesterona em bovinos”.

Pretende-se submeter esse trabalho no *Journal of Dairy Science*.

3. Referências Bibliográficas

ADAMS, D. C.; SHORT, R. E.; KNAPP, B. W. Body size and body condition effects on performance and behavior of grazing beef cows. **Nutrition Reports International**, v. 35, p. 269-277, 1987.

ARMENTANO, L. E. Ruminant hepatic metabolism of volatile fatty acids, lactate and pyruvate. **The Journal of Nutrition**. Conference: Hepatic Metabolism of Organic Acids in Ruminants. p. 838-842, 1992.

ARMSTRONG, D. G.; GONG, J. G.; WEBB, R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. **Reproduction Supplement**, v. 61, p. 403 – 414, 2003.

BARNETT, C. R. et al. Induction of cytochrome P450III and P450IV family proteins in streptozotocin-induced diabetes. **Biochemical Journal**, v. 268, p. 765–769, 1990.

BARSKI, O. A.; TIPPARAJU, S. M.; BHATNAGAR, A. The aldoketo reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. **Drug Metabolism Reviews**, v. 40, p. 553–624, 2008.

BARTLEY, J. C.; BLACK, A. L. Effects of exogenous glucose on glucose metabolism in dairy cows. **Journal of Nutrition**, v. 89, p. 317–328, 1966.

BAUMAN, D. E.; ELLIOT, J. M. Control of nutrient partitioning in lactating ruminants. In **Biochemistry of Lactation**, Ed. TB Mepham. Amsterdam: Elsevier, pp 437–468, 1983.

BEAL, W. E. et al. Influence of dietary energy intake on bovine pituitary and luteal function. **Journal. Animal Science**, v. 46, p. 181-188, 1978.

BEDFORD, C. A.; HARRISON, F. A.; HEAP, R. B. Splanchnic, uterine, ovarian and adrenal uptake of progesterone and 20 α - dihydroprogesterone in the pregnant and non-pregnant sheep. **Journal of. Endocrinology**, v. 62, p. 277–290, 1974.

BELL, A. W.; BURHANS, W. S.; OVERTON, T.R. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, p.119–126, 2000.

BERG, J. M., STRYER, L., TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BONCZEK, R. R. et al. Responses of somatotropin, insulin, prolactin, and thyroxine to selection for milk yield in Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2470–2479, 1988

BOSSAERT, P. et al. Interrelations Between Glucose-Induced Insulin Response, Metabolic Indicators, and Time of First Ovulation in High-Yielding Dairy Cows, **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3363 – 3371, 2008.

BOSSIS, I. et al. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. **Journal of Animal Science**, v.77 (6), p.1536-1546, 1999.

BOSSIS, I. et al. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: Ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. **Biology Of Reproduction**, v. 62, p. 1436–1444, 2000

BOWALGAHA, K.; et al. The glucuronidation of Δ^4 –3-keto C19- and C21-hydroxysteroids by human liver microsomal and recombinant UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): 6 α and 21 hydroxyprogesterone are selective substrates for UGT2B7. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, p. 363–370, 2007.

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, 2003a.

BUTLER, W. R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 83, p. 211–218, 2003b.

BUTLER, S. T.; PELTON, S. H.; BUTLER, W. R. 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. Inhibition of ovulation in the postpartum cow and the lactating sow. **Livestock Production Science**, v. 98, p. 5 –12, 2005.

CHAGAS, L. M et al. Invited review: 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.

DEAN, M. E.; STOCK, B. H. Hepatic microsomal metabolism of drugs during pregnancy in the rat. **Drug Metabolism Dispos.**, v. 3, p. 325–331, 1975.

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

GARNSWORTHY, P. C. et al. Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows:1. Dietary energy source and ovarian function. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3814–3823, 2008a.

GARNSWORTHY, P. C.; SINCLAIR, K. D.; WEBB, R. Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows. **Animal**, v. 2, p.1144–1152, 2008b.

GONG, J. G. et al. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. **Reproduction**, v. 123, pp. 419-427, 2002.

FRASER, C. M. **Manual merck de veterinaria**. 6. ed. São Paulo: ROCA, 1991. 2169 p.

FREETLY, H. C.; FERRELL, C. L. Net uptakes of oestradiol-17 β and progesterone across the portal-drained viscera and the liver of ewes. **Journal of Endocrinology**, v. 141, p. 353–358, 1994.

FOULADI-NASHTA, A. A. et al. Effects of dietary carbohydrate source on oocyte/embryo quality and development in high yielding lactating dairy cattle. **Biol. Reprod.**, v. 70 (Special Edition 1): Abstr. 244, 2005.

HARRISON, R. O. et al. E. Increased milk production versus reproductive and energy status of high producing dairy cows. **Journal of Dairy Science.**, v. 73, p. 2749–2758, 1990.

HIDALGO, C. O. et al. Pregnancy rates and metabolic profiles in cattle treated with propylene glycol prior to embryo transfer. **Theriogenology**, v. 62, p. 664–676, 2004.
HOVE, K. Insulin Secretion in Lactating Cows: Responses to glucose infused intravenously in normal, ketonemic, and starved animals. **Journal of Dairy Science**, v. 61, pp. 1407-1413, 1978.

HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants:from basics to the bunk. **Journal of Animal. Science.**, v. 75, pp. 852-867, 1997.

JIANG, H.; LUCY, M. C. Variants of the 5'- untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation expression and effects on translation efficiency. **Gene**, v. 265, p. 45 – 53, 2001.

KABUTUTU, Z. et al. Prostaglandin F₂α synthase activities of aldo-keto reductase 1B1, 1B3 and 1B7. **The Journal Biochemistry**, v. 145, p.161–168, 2009.

LEMLEY, C.O. et al. Short Communication: Insulin Alters Hepatic Progesterone Catabolic Enzymes Cytochrome P450 2C and 3A in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 641-645, 2008a.

LEMLEY, C. O. et al. Concomitant changes in progesterone catabolic enzymes, cytochrome P450 2C and 3A, with plasma insulin concentrations in ewes supplemented with sodium acetate or sodium propionate. **Animal**, v. 2:8, pp 1223–1229, 2008b.

LEMLEY, C. O. et al. Alterations in progesterone catabolic enzymes, CYP2C and CYP3A, in hepatocytes challenged with insulin and glucagon. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, p. 39–46, 2009.

LEMLEY, C. O.; WILSON, M. E. Effect of cytochrome P450 and aldo-keto reductase inhibitors on progesterone inactivation in primary bovine hepatic cell cultures. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 4613–4624, 2010.

LENG, R. A. Glucose synthesis in ruminants. **Advances in veterinary science and comparative medicine**, v. 14, p. 209–260, 1970.

LOOPER, M. L.; LENTS, C. A.; WETTEMANN, R. P. Body condition at parturition and postpartum weight changes do not influence the incidence of short-lived corpora lutea in postpartum beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 81, p.2390–2394, 2003.

LOPES, N.C. et al. Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of Bos indicus beef cows. **Journal of Animal Science**. v. 87, pp. 3935-3943, 2009.

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

LUCY, M. C. et al. Expression of somatotropin receptor messenger ribonucleic acid in bovine tissues. **Journal Dairy Science**, v. 81, p. 889 – 1895, 1998.

MACKEY, D. R. et al. The effect of acute nutritional change on follicle wave turnover, gonadotropin, steroid concentration in beef heifers. **Journal Animal Science**, v.78, p.429-442, 2000.

MILLER, H. M. et al. The effects of feed intake and body fatness on progesterone metabolism in ovariectomized gilts. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 3253–3261, 1999.

MORIEL, P. et al. Concentrations of Progesterone and Insulin in Serum of Nonlactating Dairy Cows in Response to Carbohydrate Source and Processing. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4616-4621, 2008.

MURRAY, M. Microsomal cytochrome P450-dependent steroid metabolism in male sheep liver. Quantitative importance of 6 β -hydroxylation and evidence for the involvement of a P450 from the IIIA subfamily in the pathway. **Journal Steroid Biochemistry**, Mol. Biol., v. 38, p. 611–619, 1991.

MURRAY, M. Participation of a cytochrome P450 enzyme from the 2C subfamily in progesterone 21-hydroxylation in sheep liver. **Journal Steroid Biochemistry. and Molecular. Biology**, v. 43, p.591–593, 1992.

NELSON, D. L., COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry. **W. H. Freeman and Company**, 4. ed. New York, 2005.

NUSSEY, S. S.; WHITEHEAD, S. A. **Endocrinology: An integrated approach**. Oxford, U.K: **BIOS Scientific**, 2001.

PARR, R. A. Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 80, p. 317–320, 1987.

PARR, R. A. et al. Liverblood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 55, p. 311 – 316, 1993.

PENNING, T. M. et al. Human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1–AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: Functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. **The Journal Biochemistry**, v. 351, p. 67–77, 2000.

PESCARA, J. B. et al. Effect of finely ground corn intake after fixed-time artificial insemination on serum progesterone concentrations and conception rates of grazin beef cows. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia** (Submetido). Belo Horizonte/MG, 2009.

PHILIPPE, J. Structure and pancreatic expression of the insulin and glucagon genes. **Endocrine Reviews**, v. 12, p. 252–271, 1991.

PRIME, G. R., SYMONDS, H. W. Influence of plane of nutrition on portal blood flow and the metabolic clearance rate of progesterone in ovariectomized gilts. **Journal of Agricultural Science**, v. 121, p.389–397, 1993.

REYNOLDS, C. K.; HARMON, D. L.; CECAVA, M. J. Absorption and delivery of nutrients for milk protein synthesis by portal-drained viscera. **Journal of Dairy Science**, v. 77, pp. 2787-2808, 1994.

RHINEHART, J. D. et al. Low peripheral progesterone and late embryonic/early fetal loss in suckled beef and lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 71, p. 480 – 490, 2009.

RUCKPAUL, K; REIN, H. Effect of enzyme inducers on biotransformation. **Zeitschrift für die Gesamte Hygiene und Ihre Grenzgebiete** Sep;30 (9), p. 482-4, 1984.

ROCHE, J. F. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. :282–296, 2006.

SAAD, B. et al. Oxygen tension, insulin, and glucagon affect the preservation and induction of cytochrome P450 isoforms in cultured rat hepatocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 126, p. 372–379, 1994.

SANGSRITAVONG, S. et al. High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. **Journal of Dairy Sci.**, v. 85, p. 2831-2842, 2002.

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

SHIMOJO, N. et al. Changes in amounts of cytochrome P450 isozymes and levels of catalytic activities in hepatic and renal microsomes of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Biochemical Pharmacology**, v. 46, p. 621–627, 1993.

SINCLAIR, K. D., MOLLE, G., REVILLA, R., ROCHE J. F., QUINTANS G., MARONGIU, L., SANZ, A., MACKEY, D. R., DISKIN, M. G. 2002. Ovulation of the first dominant follicle arising after day 21 post partum in suckling beef cows. **Journal of Animal Science**. v.75: p.115-126.

SMITH, D. L. Diet-induced alterations in progesterone clearance appear to be mediated by insulin signaling in hepatocytes. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1102–1109, 2006.

SMITH, J. M. D. Mathematical Modeling of Glucose Homeostasis and Its Relationship With Energy Balance and Body Fat. **Integrative Physiology**, v. 17, p. 632 – 639, 2009.

SPENCER, T. E.; F. BAZER, W. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 1879-1898, 2002.

SYMONDS, H. W.; PRIME, G. R. The influence of volume of food intake by gilts on blood flow in the portal vein and clearance of progesterone from plasma. **Animal Production**, v. 48, p. 620–621, 1989.

VAN KNEGSEL, A. T. et al. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p. 665–688, 2005.

VASCONCELOS, J. L. M. C. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. **Theriogenology**, v. 60, p. 795-807, 2003.

VASCONCELOS, J. L. M. Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to heat stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. **Biology of Reproduction**, 56 (Suppl. 1):140(Abstr.), 1997.

VEERKAMP, R. F.; BEERDA, B.; VAN DER LENDE, T. Effects of genetic selection for milk yield on energy balance, levels of hormones, and metabolites in lactating cattle, and possible links to reduced fertility. **Livestock Production Science**, v. 83 pp. 257–275, 2003.

VIEIRA, F. V. R et al. Effects of intravenous glucose infusion and nutritional balance on serum concentrations of NEFA, glucose, insulin, and progesterone in non-lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 3047–3055, 2010.

VIZCARRA, J. A. et al. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin, and nonesterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 927–936, 1998.

WASHBURN, S. P. Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 244–251, 2002.

WAXMAN, D. J. et al. Steroid hormone hydroxylase specificities of eleven cDNA-expressed human cytochrome P450s. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 290, p. 160-166, 1991.

WEBB, R. et al. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. E63-74E, 2004.

WILTBank, J. N. et al. Effect of energy level on reproductive phenomena of mature Hereford cows. **Journal of Animal Science**, v. 21, p. 219-225, 1962.

YOU, L. Steroid hormone biotransformation and xenobiotic induction of hepatic steroid metabolizing enzymes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 147, p. 233–246, 2004.

YOUNG, J. W. Gluconeogenesis in cattle: Significance and methodology. **Journal of Dairy Science**, v. 60, pp. 1-15, 1977.

CAPÍTULO 2

INFUSÃO INTRAVENOSA DE GLICOSE E BALANÇO ENERGÉTICO NA EXPRESSÃO DE ENZIMAS HEPÁTICAS RESPONSÁVEIS PELO CATABOLISMO DE PROGESTERONA EM BOVINOS

Infusão intravenosa de glicose e balanço energético na expressão de enzimas hepáticas responsáveis pelo catabolismo de progesterona em bovinos

RESUMO

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da infusão intravenosa de glicose sobre as concentrações séricas de glicose, insulina, IGF-1, P4, expressão de RNAm de GHR1A e IGF-1, e expressão de RNAm das enzimas hepáticas CYP2C e CYP3A, responsáveis pelo catabolismo de P4 no fígado, em vacas leiteiras secas, ovariectomizadas e com dispositivo intravaginal de P4 (CIDR) em diferentes BE. Foram utilizadas 15 vacas mestiças Holandês/Gir ovariectomizadas e secas, aleatoriamente distribuídas em um de dois tratamentos nutricionais: 1) BEN (n=7) e 2) BEP (n=8). O grupo de vacas em BEP recebeu concentrado individualmente uma vez ao dia. Durante a fase de adaptação (d-28 ao d-15,5), cada vaca recebeu um CIDR de terceiro uso, sendo que após esta fase (d-14), cada vaca recebeu um CIDR novo. No d 0, as vacas foram aleatoriamente distribuídas em *crossover design* contendo dois períodos de 24 horas cada (d 0 e d 1): 1) infusão intravenosa de glicose (0,5g/Kg de PV) ou 2) infusão intravenosa de salina (0,9% NaCl). Imediatamente após jejum de 12 horas, as infusões foram feitas em período de três horas. Amostras de sangue foram coletadas às -12 (início do jejum), 0 (antes da infusão), 3 e 6 horas após início da infusão através da veia coccígea em tubos tipo vacutainer. As biopsias hepáticas foram feitas às 0 e 3 horas nos dias do tratamento (d 0 e d 1). Vacas em BEN perderam mais PV e ECC em relação às vacas em BEP (-23,15 vs. 16,5 kg $\pm$ 3,9; - 0,200 vs. 0,075 unidades de ECC $\pm$ 0,062, respectivamente). Vacas recebendo infusão intravenosa de glicose tiveram maiores concentrações séricas de glicose às 3 horas do início da infusão do que vacas recebendo salina. Vacas em BEN recebendo glicose tiveram maiores concentrações séricas de insulina do que vacas em BEP recebendo glicose às 3 horas pós-infusão, entretanto vacas em BEP recebendo glicose tiveram maiores concentrações séricas de insulina do que vacas recebendo salina. Não houve efeito pós-infusão de tratamentos para expressão de CYP2C. Em vacas em BEP, infusão de glicose reduziu expressão de CYP3A, sem mudança nas concentrações séricas de P4, enquanto que em vacas BEN, infusão de glicose aumentou expressão de CYP3A e reduziu as concentrações séricas de P4. Em

conclusão, os efeitos da infusão de glicose nas concentrações séricas de insulina, P4 e expressão CYP3A dependem do estado nutricional.

Palavras chaves: vacas, insulina, citocromo P450 2C, citocromo P450 3A

Intravenous glucose infusion and nutritional balance on expression of enzymes responsible for catabolism of progesterone in bovines

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of intravenous glucose infusion on serum concentrations of glucose, insulin, IGF-1, progesterone (P4), mRNA expression of GHR1A, IGF-1, and mRNA expression of hepatic enzymes CYP 2C and CYP 3A responsible for the catabolism of P4 in the liver in dry cows, ovariectomized with intravaginal device P4 (CIDR) in different energy balances. Fifteen non-lactating, ovariectomized Gir × Holstein cows, and randomly assigned to: 1) negative nutrient balance (NB; n=7)) and 2) positive nutrient balance (PB; n=8). The group of cows in PB was supplemented individually once a day. For the adaptation phase (d-d-28 to 15, 5), each cow received a CIDR of the third use, and after the adaptation phase (d-14), each cow received a new CIDR. On d 0, cows within nutritional treatment were randomly assigned to receive, in a crossover design containing 2 periods of 24 h each (d0 and d1): 1) intravenous glucose infusion (0.5g/Kg of BW), or 2) intravenous saline infusion (0,9% NaCl). Immediately after fasting for 12 hours, infusions were made over a period of three hours. Blood samples were collected at -12 (beginning of fasting), 0 (before infusion), 3 and 6 hours after start of infusion via the coccygeal vein in vacutainer tubes without anticoagulant type. The liver biopsies were performed at 0 and 3 hours in the day of treatment (d 0 and d 1). NB cows lost more BW and BCS than PB cows (-23.15 vs. 16.5 kg ± 3.9, vs. -0.200. 0.075 ± 0.062 BCS units, respectively). Cows receiving intravenous infusion of glucose had higher serum concentrations of glucose to 3 hours for the start of infusion than cows receiving saline. NB cows receiving glucose had higher serum concentrations of insulin than PB cows receiving glucose, however PB cows receiving glucose had higher serum concentrations of insulin than cows receiving saline at 3 hours. There was no effect of post-infusion treatments for CYP2C expression. In PB cows, glucose infusion reduced the expression of CYP3A, there was no effect in serum concentration of P4, whereas in NB cows, glucose infusion increased expression of CYP3A and decreased serum concentration of P4. In conclusion, the effects of glucose infusion on serum insulin, progesterone and CYP3A expression depend on the nutritional status.

Keywords: cows, insulin, cytochrome P450 2C, cytochrome P450 3A

1. Introdução

Baixa fertilidade em vacas leiteiras tem sido associada à alta demanda metabólica, como resultado de contínua seleção para produção de leite, com alteração de perfis hormonais e da fertilidade (Chagas et al., 2007; Leroy et al., 2008). O consumo de energia é associado ao melhor desempenho reprodutivo (Schillo et al., 1992), sendo os efeitos benéficos do melhor aporte energético na reprodução regulados, em parte, pela circulação de hormônios e metabólitos, tais como glicose, insulina e IGF-1 (Wettemann et al., 2003).

Butler (2005) verificou que a taxa de concepção diminuiu em 10% para cada perda de 0,5 unidade de ECC e Pescara et al. (2009) observaram que vacas com menor ECC ($< 5,0$) apresentaram menor concentração sérica de P4, menor taxa de concepção e maior perda embrionária quando comparadas com vacas com maior ECC ($\geq 5,0$). Estes dados em conjunto sugerem que vacas com maior perda de condição corporal, menores concentrações de glicose e insulina podem ter menores concentrações de P4, o que compromete o desempenho reprodutivo.

Além disso, vacas em restrição alimentar e menor ECC têm menores concentrações séricas de insulina; baixas concentrações séricas de insulina reduzem a expressão de GHR e RNAm de IGF-1 no fígado, modulando as concentrações séricas de GH e IGF-1 (Butler et al., 2003), o que pode prejudicar o desempenho reprodutivo. Neste mesmo sentido, Vieira et al. (2010) observaram que vacas em BEN recebendo glicose tiveram aumento de insulina, porém não houve alteração do catabolismo de P4, segundo proposto por Lemley et al. (2008), podendo sugerir que, talvez, IGF-1 tenha impacto no catabolismo de P4.

Gong et al. (2002) relataram que vacas leiteiras com elevada concentração sérica de insulina pós-parto tiveram menor intervalo do parto até a ovulação em comparação às vacas com reduzida concentração sérica de insulina. Por outro lado, em vacas alimentadas com dieta que induziu maiores concentrações séricas de insulina, houve impacto negativo sobre a qualidade e desenvolvimento de oócitos e embriões (Armstrong et al., 2003; Fouladi-Nashta et al., 2005).

A P4 é um hormônio necessário para o estabelecimento e manutenção da prenhez (González-Padilla et al., 1975; Spencer & Bazer, 2002; Looper et al., 2003; Lemley & Wilson, 2010). Uma porção de perda embrionária e fetal precoce em vacas leiteiras pode ser explicada por baixas concentrações séricas de P4, as

quais podem ser resultado de aumento no catabolismo, diminuição da produção ou ambos (Inskeep e Dailey, 2005).

A insulina influencia positivamente a síntese e liberação de LH pela hipófise (Monget & Martin, 1997), estimula a síntese luteal (Spicer e Echternkamp, 1995), pode afetar a reprodução em bovinos modulando a expressão de enzimas hepáticas, tais como CYP2C e CYP3A (Murray, 1991; Lemley et al., 2008a), modula as concentrações séricas (Moriel et al., 2008; Lopes et al., 2009) e reduz o catabolismo hepático (Murray, 1991; Lemley et al., 2008a) de P4.

Vacas com menor ECC (Spicer et al., 1990) têm menores concentrações de LH (Jolly et al., 1995), menor folículo dominante (Roche et al., 2000), menor corpo lúteo (Vanderhaar et al. 1995) e menor concentração sérica de P4 (Spicer et al., 1990, Villa-Godoy et al., 1990; Butler, 2000; Roche et al., 2000), porém Hasler et al. (1980) observaram que o tamanho do corpo lúteo não influenciou nas concentrações séricas de P4.

Em vacas recebendo infusão intravenosa de glicose, foi demonstrado que houve aumento nas concentrações séricas de glicose e insulina para vacas em BEN e BEP, porém houve aumento nas concentrações séricas de P4 apenas para vacas em BEP (Vieira et al., 2010). Este resultado foi atribuído à redução no catabolismo de P4, dado que as vacas eram ovariectomizadas e suplementadas com fonte exógena de P4.

O catabolismo de P4 ocorre principalmente no fígado via subfamílias do CYP2C e CYP3A. O mecanismo proposto por Lemley et al. (2008a) sugere que a elevação nos níveis de insulina pode diminuir expressão e atividade destas enzimas hepáticas responsáveis pelo catabolismo de P4.

Lemley et al. (2008a) relataram os efeitos da insulina na expressão hepática das enzimas catabólicas de P4 em vacas leiteiras em BEN. Entretanto, estes autores não avaliaram as concentrações séricas de P4 diretamente relacionadas com elevadas concentrações séricas de insulina e expressão reduzida destas enzimas.

Pouca informação existe sobre a regulação das enzimas que catabolizam P4 em bovinos. Estes mecanismos fisiológicos são importantes e necessitam maiores investigações, uma vez que insulina e P4 circulantes estão relacionadas à função reprodutiva em bovinos. Assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito da infusão intravenosa de glicose sobre as concentrações séricas de glicose, insulina, IGF-1, P4, expressão de RNAm de GHR1A e IGF-1, e expressão de RNAm das

enzimas hepáticas CYP2C e CYP3A, responsáveis pelo catabolismo de P4 no fígado, em vacas leiteiras secas, ovariectomizadas e com dispositivo intravaginal de P4 (CIDR) em diferentes BE.

A hipótese é que a infusão intravenosa de glicose aumenta as concentrações séricas de insulina em vacas em BEN e BEP, e diminui a expressão de RNAm das enzimas hepáticas CYP2C e CYP3A, responsáveis pelo catabolismo de P4, apenas em vacas em BEP.

2. Material e Métodos

O ensaio foi conduzido na Universidade Estadual Paulista (UNESP), na Fazenda Experimental Lageado, localizada em Botucatu, São Paulo, Brasil.

2.1. Animais e dietas

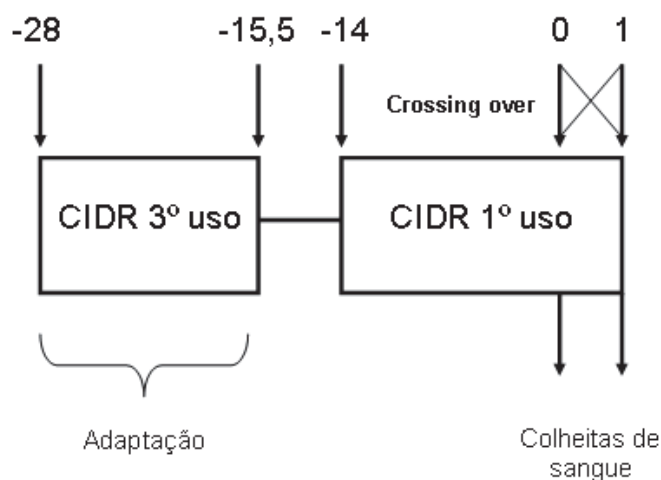
Foram utilizadas quinze vacas mestiças Holandês/Gir ovariectomizadas e secas ($n=15$, PV= 654,53 kg $\pm$ 85,34, ECC inicial = 3,6 $\pm$ 0,34) estratificadas de acordo com o PV e ECC (Wildman et al., 1982), e aleatoriamente distribuídas em um de dois tratamentos nutricionais no d-28 do experimento: 1) BEN ($n=7$) e 2) BEP ($n=8$). Do d - 28 ao d 0, as vacas permaneceram em dois pastos de *Brachiaria brizantha* de acordo com o tratamento nutricional, com menor (média de 47% de NDT, 7,6 % de PB e 60,0% de FDN, com base na MS) ou maior qualidade de forragem (média de 54% de NDT, 12,2 % de PB e 54,0% de FDN, com base na MS) e menor (média de 4,5 kg de MS / vaca / dia) ou maior disponibilidade de forragem (média de 10,0 kg de MS / vaca / dia). Ambos os grupos receberam suplemento mineral completo (7,7% de Ca, 4,0% de P, 3,0% de Na, 0,20% de K, 0,20% de Mg, 2,0% de S, 0,002% de Co, 0,03% de Cu, 0,002% de I, 0,02% de Mn , 0,13% de Zn, e 0,02% de F) e água *ad libitum* durante todo o experimento. O grupo de vacas em BEP foi suplementado individualmente uma vez ao dia às 12 horas, com adaptação por quatorze dias (d-28 ao d-15) com 2,0 kg de ração/vaca/dia, e após este período foram fornecidos 4,5 Kg de ração/vaca/dia por mais quatorze dias (d-14 ao d0). O concentrado consistiu de (base MS) 66,02% de milho moído, 27,73% de farelo de soja, 2,5% de mistura mineral (18% de Ca, 10,7% de Na, 8% de P, 1,2% de S, 0,5% de Mg, 0,13% de Cu , 0,007% de Co e 0,007% de I), 2,5% de calcário e 1,25% de ureia. O conteúdo nutricional de concentrado foi estimado em (base MS) 78% de NDT, 22,5% de PB e 12,9% de FDN. Tratamentos nutricionais foram projetados de acordo com o sistema de avaliação e formulação de

dietas CNCPS - Cornell versão 5. e formulados para induzir a perda de PV (-1,0 kg/dia) em vacas em BEN e ganho de PV (0,25 kg/dia) em vacas em BEP.

2.2. Dispositivo intravaginal de progesterona

Durante o período de adaptação (d-28 ao d-15,5), cada vaca recebeu um dispositivo intravaginal de P4 (CIDR® 1,9 g de progesterona, Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil) de terceiro uso (CIDR 3º uso), para adaptação das enzimas hepáticas à P4, sendo que após a fase de adaptação (d-14), cada vaca recebeu um novo CIDR (CIDR 1º uso), para que no dia da colheita de sangue o dispositivo estivesse nos dias 14/15 após a inserção (Figura 1).

Figura 1. Esquema de disposição de CIDR e colheitas de sangue



2.3. Infusão de glicose e colheitas de sangue

No d 0, as vacas foram aleatoriamente distribuídas em um *crossover design* contendo 2 períodos de 24 horas cada (d 0 e d 1): 1) infusão intravenosa de glicose (Glicose; 0,5 g/kg de PV; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas) ou 2) infusão intravenosa de solução fisiológica (Salina; 0,9% NaCl; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas). As infusões de ambos os tratamentos foram feitas pela veia jugular com Cateter Venoso para a Introdução Percutânea Uni Lúmen (Biocat®) com agulha 14 GA e 30 cm

(Biomedical®, SP, Brasil) por três horas, imediatamente após o jejum de 12 horas. No começo de cada período, todas as vacas foram submetidas a jejum de 12 horas. No momento em que se iniciou o jejum (12 horas antes da infusão dos tratamentos), foram realizadas colheitas de sangue para verificar os níveis basais de glicose, insulina, IGF-1 e P4 e estabelecer seus valores para vacas em BEN e BEP. Amostras de sangue foram coletadas às -12 horas (início do jejum) e às 0 (antes da infusão), 3 e 6 horas após o início da infusão através da veia coccígea em tubos tipo Vacutainer sem anticoagulante (10 ml; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). Após a última amostra de sangue do período 1, todas as vacas retornaram para os respectivos pastos e receberam (BEP) ou não (BEN) concentrado. As vacas foram submetidas ao jejum antes da infusão para evitar confundimento entre os efeitos de ingestão de alimentos e tratamentos de infusão nas concentrações séricas de P4 (Vasconcelos et al., 2003). Imediatamente após a colheita, os tubos foram centrifugados e o soro extraído foi acondicionado em frascos “eppendorf” e congelado a -20°C até o momento das análises laboratoriais.

2.4. Biopsias hepáticas

As biopsias hepáticas foram feitas no dia do tratamento (d 0 e d 1) às 0 e às 3 horas após o início da infusão em vacas recebendo glicose ou salina. O pêlo foi removido do lado direito e a pele dos animais foi escovada duas vezes com iodo. O espaço para a biopsia foi entre a 11ª e 12ª costela e foi anestesiado com Lidocaina. Foi feita uma incisão de aproximadamente 1 cm na pele, sendo puncionada usando bisturi e agulha para biopsia de 14 GA X 15 cm (TRU-CUT; Allegiance) foi usada para coletar as amostras de fígado, de acordo com os procedimentos descritos por Lemley (2007). O lado da incisão foi suturado e tratado com Furacin powder (Durvet, Inc., Blue Springs, MO). As amostras foram congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C em *TRizol Reagent* (Invitrogen Life Technologies) até as análises laboratoriais.

2.5. Investigação da expressão do RNAm

Para as análises laboratoriais, as amostras de fígado foram descongeladas e homogeneizadas com *Polytron* e submetidas imediatamente à extração total do RNA do tecido, de acordo com o descrito no protocolo do fabricante (*TRIzol Reagent*).

Após a extração, a concentração de RNA total das amostras foi mensurada por espectrofotômetro NanoDrop® ND 1000. As amostras foram tratadas com DNase (Invitrogen®), conforme protocolo do fabricante, para eliminação de possível contaminação com DNA genômico e submetidas à transcrição reversa (RT-PCR). Para a RT-PCR, foi utilizado o “kit” SuperScript III (Invitrogen®) com oligonucleotídeo poli T (12 a 18 nucleotídeos).

A expressão dos genes alvo CYP2C, CYP3A, GHR1A e IGF-1 foi investigada por ensaio de PCR em tempo real utilizado o sistema Power Sybr®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) no ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem). A identidade dos amplicons foi confirmada pela análise de seu tamanho por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% e curva de dissociação.

A expressão relativa de cada gene alvo foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ e foi corrigida pela eficiência de amplificação das reações utilizando-se a equação descrita por Pfaffl (2001). Os valores médios de eficiência para cada gene foram calculados pelo perfil de amplificação de amostras individualmente pelo programa LinRegPCR (Ramakers et al., 2003). Para cada primer, a linha de *threshold* foi fixada no ponto médio da janela de linearidade, determinada pelos valores mínimos e máximos de fluorescência. Os genes β -actina, CYC-A, GAPDH e RPS9 foram testados por meio do programa geNorm (Microsoft®) para seleção do controle endógeno mais estável para o fígado bovino, sendo escolhido o CYC-A como gene endógeno. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para os genes alvo e endógenos estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para os genes alvo (CYP2C, CYP3A, GHR1A e IGF-1) e endógenos (β -actina, CYC-A, GAPDH e RPS9), temperatura em graus Celsius (T°C) de anelamento, eficiência e referência bibliográfica

Gene	Sequência	T °C anelamento	Eficiência	Referência
CYP2C	forward: 5'-TATGGACTCCTGCTCCTGCT-3'	60	97.50%	Lemley et al., 2008a
	reverse: 5'-CATCTGTGTAGGGCATGCGAG-3'			
CYP3A	forward: 5'-GTGCCAATCTCTGTGCTTCA-3'	60	101%	Lemley et al., 2008a
	reverse: 5'-CCAGTTCCAAAAGGCAGGTA-3'			
GHR1A	forward: 5'-CCAGCCTCTGTTTTCAGGAGTG-3'	60	92%	Hauser et al., 1990
	reverse: 5'-TGCCACTGCCAAGGTCAAC-3'			
IGF-1	forward: 5'-ACCCCTGGAGTTGGTAGATTGCTGT-3'	60	89,1%	GenBank: X15726.1
	reverse: 5'-CACCCATGCATTTGTGGCTCTTGA-3'			
β-actina	forward: 5'-GCGTGGCTACAGCTTTCACC-3'	60	100%	Janovick-Guretzky et al., 2007
	reverse: 5'-TTGATGTCACGGACGATTTC-3'			
CYC-A	forward: 5'-GCCATGGAGCGCTTTGG-3'	60	102%	Machado et al., 2009
	reverse: 5'-CCACAGTCAGCAATGGTGATCT-3'			
GAPDH	forward: 5'-GGCGTGACCCACGAGAAGTATTAA-3'	62	99.90%	Machado et al., 2009
	reverse: 5'-CCCTCCACGATGCCAAAGT-3'			
RPS9	forward: 5'-CCTCGACCAAGAGCTGAAG-3'	60	100%	Janovick-Guretzky et al., 2007
	reverse: 5'-CCTCCAGACCTCACGTTTGTTC-3'			

2.6. Dosagens

Glicose. Método enzimático colorimétrico (Katal[®] Biotecnológica Ind. Com. Ltda.) no Laboratório Clínico do Hospital Veterinário (LC) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)/UNESP/Botucatu.

Insulina. Radioimunoensaio (RIA) com anticorpo em fase sólida (Cout-A-Count kit; DPC[®] Diagnostic Products Inc., Los Angeles, CA). O coeficiente de variação foi de 6,9%, sendo as concentrações mínimas detectadas de 0,05 µUI/mL, no Laboratório de Endocrinologia Animal/UNESP/Araçatuba.

IGF-1 livre. Imunoensaio imunométrico (IMMULITE 2000 IGF-I) de fase sólida, marcado enzimaticamente por quimioluminescência no Grupo São Camilo – Medicina Diagnóstica (Veterinária)/Maringá.

Progesterona. Radioimunoensaio (RIA) com anticorpo em fase sólida (Cout-A-Count kit; DPC[®] Diagnostic Products Inc., Los Angeles, CA). O coeficiente de variação foi de 5,8%, sendo as concentrações mínimas detectadas de 0,1 ng/mL, no Laboratório de Endocrinologia Animal/UNESP/Araçatuba.

Investigação da expressão de RNAm. PCR em tempo real no Laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana do Instituto de Biociências/UNESP/Botucatu.

2.7. Métodos Estatísticos

Os dados foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC) e da aproximação Satterthwaite para determinar os graus de liberdade do denominador para os testes de efeitos fixos. O modelo estatístico usado para mudanças em PV e ECC continha os efeitos de tratamento nutricional (BEN e BEP). Os dados foram analisados usando vaca (tratamento nutricional) como variável aleatória. Dados fisiológicos coletados no começo do jejum foram analisadas independentemente daqueles coletados imediatamente antes ou após as infusões devido ao significativo intervalo e efeito do jejum entre estas colheitas, considerando que medidas no mesmo animal coletadas em tempo próximo são potencialmente mais correlacionadas do que amostras coletadas em tempos mais afastados (Littell et al., 1998). Os modelos estatísticos usados para os dados fisiológicos no começo do jejum continham os efeitos do tratamento nutricional e foram analisados usando vaca (tratamento nutricional) como variável aleatória. Os modelos estatísticos usados para os dados fisiológicos após o jejum continham os efeitos de tratamento nutricional,

tratamento de infusão (Glicose e Controle), variáveis de tempo, e as interações adequadas. Dados coletados imediatamente antes da infusão dos tratamentos foram adicionados nesse modelo como covariáveis independentes. Dados foram analisados usando vaca (tratamento nutricional) como variável aleatória. O termo específico para as medidas repetidas foi vaca (tratamento nutricional x infusão x dia) e a estrutura de covariância utilizada foi auto-regressiva, a qual proporcionou o melhor ajuste para estas análises de acordo com o critério de informação Akaike. Todos os resultados foram separados usando LSD. A significância foi estabelecida como $P \leq 0,05$ e tendências são declaradas se $P > 0,05$ e $\leq 0,10$. Os resultados são apresentados de acordo com os efeitos do tratamento, se não houver interações significativas ou de acordo com a maior ordem de interação detectada.

3. Resultados

Vacas em BEN perderam mais PV e ECC em relação às vacas em BEP (Tabela 2).

Tabela 2. Mudanças no PV e ECC do d -28 ao d 0 do experimento e concentrações séricas de glicose, insulina, IGF-1 e P4 no início do jejum (12 horas antes da infusão dos tratamentos) de vacas ovariectomizadas e secas em BEN ou BEP¹

Item	BEN ²	BEP ³	SEM	P-value
Mudança de PV, kg	-23,15	16,5	3,9	0,01
Mudança no ECC (1 a 5) ⁴	-0,2	0,075	0,062	0,02
Glicose, mg/dL	65,3	61,7	2,1	0,23
Insulina, μ UI/mL	5,82	6,33	0,86	0,69
IGF-1, ng/mL	126,01	85,97	12,7	0,04
P4, ng/mL	1,72	1,33	0,13	0,05

¹ Mudanças no ECC e PV foram calculadas pelas medidas obtidas no d -28, d-14 e d 0. Colheitas de sangue foram realizadas no início do jejum de 12 horas

² Vacas em BEN foram mantidas em pasto de *Brachiaria brizantha* com menor disponibilidade de foragem;

³ Vacas em BEP foram mantidas em pasto de *Brachiaria brizantha* com maior disponibilidade de foragem e receberam diariamente 2 kg/vaca de concentrado do d -28 ao d -15 e 4,5 kg/vaca do mesmo concentrado do d -14 ao d 0;

⁴ De acordo com Wildman et al. (1982);

No início do jejum, as concentrações séricas de glicose não diferiram (Tabela 2) entre vacas em BEN e BEP.

Foi detectada uma interação entre infusão e tempo ($P < 0,01$) para concentrações séricas de glicose, independentemente do tratamento nutricional. Vacas recebendo infusão intravenosa de glicose tiveram maiores concentrações séricas de glicose às 3 horas relativas ao início da infusão do que vacas recebendo salina (Figura 2).

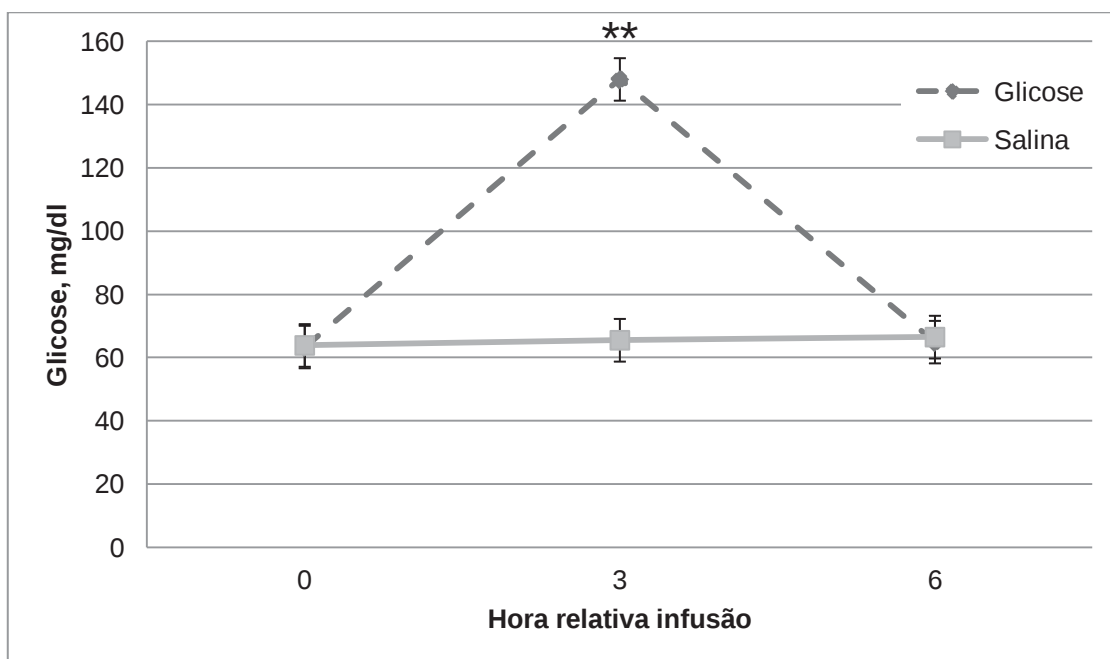


Figura 2. Concentrações séricas de glicose (mg/dL) em vacas não lactantes infundidas via intravenosa com solução de glicose a 5% (Glicose; 0,5g/kg de PV; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas) ou com solução fisiológica (Salina; 0,9% NaCl; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas). Comparação do tratamentos nas horas: ** $P < 0,01$

As concentrações séricas de insulina foram semelhantes para vacas em BEN e BEP (Tabela 2) no início do jejum. Foi detectada uma interação ($P = 0,02$) entre balanço energético, infusão e tempo nas concentrações séricas de insulina. Após a infusão, vacas que receberam infusão intravenosa de glicose tiveram maiores concentrações séricas de insulina às 3 horas do que vacas que receberam salina. Vacas em BEN recebendo glicose apresetaram maiores concentrações séricas de insulina do que vacas em BEP (Figura 3).

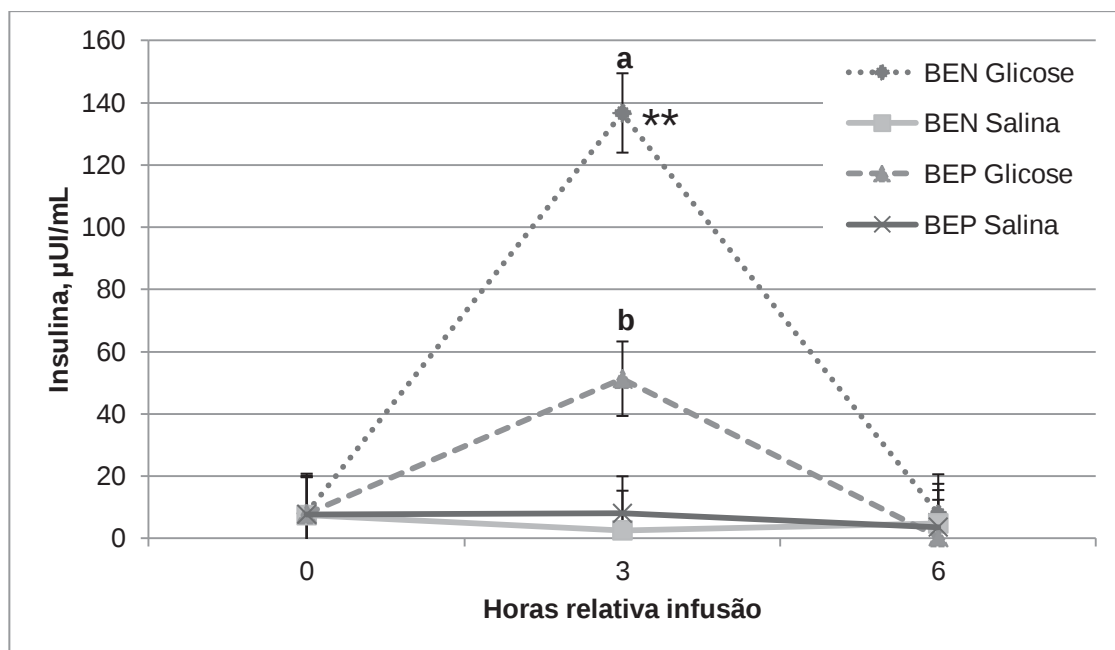


Figura 3. Concentrações séricas de insulina ($\mu\text{IU/mL}$) em vacas não lactantes infundidas via intravenosa com solução de glicose a 5% (Glicose; 0,5g/kg de PV; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas) ou com solução fisiológica (Salina; 0,9% NaCl; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas) Horas designadas com letras indicam diferenças entre os seguintes tratamentos: a = BEN Glicose vs. BEN Salina ($P < 0,01$); b = BEP Glicose vs. BEP Salina ($P < 0,05$). Comparação nas horas para vacas em BEN e BEP recebendo infusão intravenosa de glicose: ** $P < 0,01$.

Expressão de RNAm de GHR1A foi semelhante às 0h (Tabela 3) para vacas em BEN e BEP. Foi detectada uma interação entre balanço energético e infusão. Em vacas BEN, infusão de glicose aumentou expressão de GHR1A, enquanto em vacas BEP, infusão de glicose reduziu expressão de GHR1A (Tabela 4).

Tabela 3. Expressão relativa de RNAm de CYP2C, CYP3A, GHR1A e IGF-1 às 0h de vacas ovariectomizadas e secas em BEN ou BEP¹

Item	BEN ²	BEP ³	SEM	P-value
CYP2C	1,04	0,89	0,13	0,41
CYP3A	0,98	0,79	0,12	0,25
GHR1A	2,8	2,68	0,31	0,78
IGF-1	3,94	2,20	0,62	0,07

¹ Biopsias de de fígado, para investigação da expressão do RNAm, foram feitas às 0h (imediatamente antes da infusão dos tratamentos);

² Vacas em BEN foram mantidas em pasto de *Brachiaria brizantha* com menor disponibilidade de foragem;

³ Vacas em BEP foram mantidas em pasto de *Brachiaria brizantha* com maior disponibilidade de foragem e receberam diariamente 2 kg/vaca de concentrado do d -28 ao d -15 e 4,5 kg/vaca do mesmo concentrado do d -14 ao d 0;

Tabela 4. Expressão relativa de RNAm de GHR1A às 3 horas pós-infusão em vacas não lactantes infundidas via intravenosa com solução de glicose a 5% (Glicose; 0,5g/kg de PV; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas) ou com solução fisiológica (Salina; 0,9% NaCl; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas)

Tratamento	BEN	BEP
Glicose	3,53 ± 0,33 ^{a,c}	2,34 ± 0,30 ^{b,c}
Salina	2,25 ± 0,33 ^{a,d}	3,63 ± 0,30 ^{b,d}

(a,b): Letras distintas nas linhas referem-se a diferenças significativas (P < 0,05)

(c,d): Letras distintas nas colunas referem-se a diferenças significativas (P < 0,05)

Antes da infusão dos tratamentos, expressão de RNAm de IGR-1 foi maior (Tabela 3) em vacas em BEN comparadas às vacas em BEP.

No início do jejum, as concentrações séricas de IGF-1 foram maiores (Tabela 2) em vacas em BEN comparadas às vacas em BEP.

Foi detectada uma interação entre infusão e tempo (P = 0,04) para concentrações séricas de IGF-1, independentemente do tratamento nutricional. Vacas recebendo infusão intravenosa de salina tiveram menores concentrações séricas de IGF-1 às 6 horas relativas ao início da infusão do que vacas recebendo salina (Figura 4).

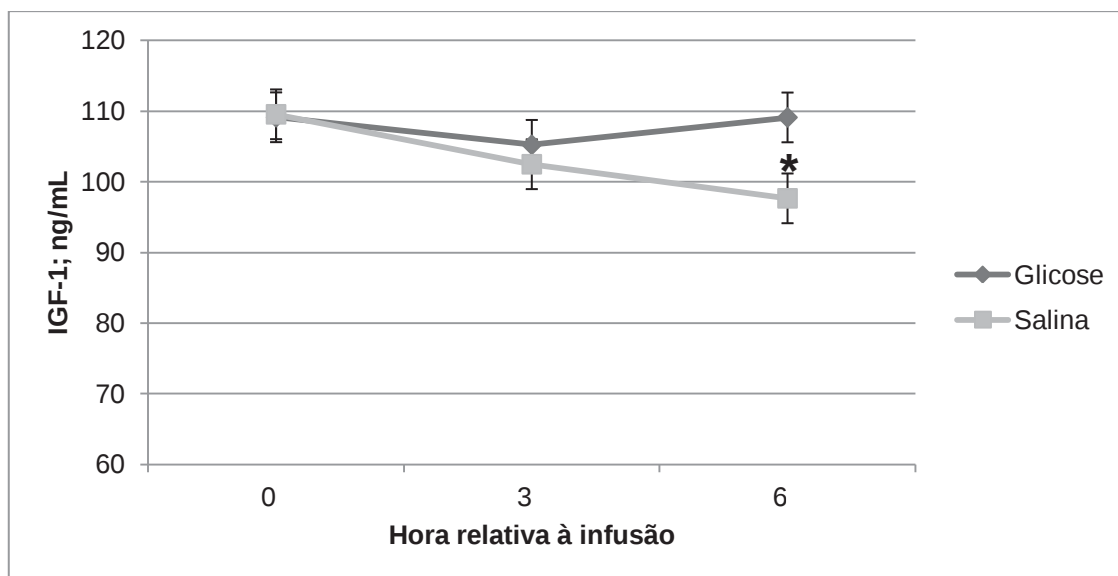


Figura 4. Concentrações séricas de IGF-1 (ng/mL) em vacas não lactantes infundidas via intravenosa com solução de glicose a 5% (Glicose; 0,5g/kg de PV; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas) ou com solução fisiológica (Salina; 0,9% NaCl; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas). Comparação do tratamentos nas horas: * P = 0,04

Expressão de RNAm de CYP2C e CYP3A foi semelhante às 0h (Tabela 3) para vacas em BEN e BEP.

Infusão de glicose aumentou expressão de CYP3A em vacas em BEN e reduziu em vacas em BEP às 3 horas relativas ao início da infusão (Tabela 5). Não houve efeito pós-infusão de tratamentos para expressão de RNAm de CYP2C.

Tabela 5. Expressão relativa de RNAm de CYP3A às 3 horas pós-infusão em vacas não lactantes infundidas via intravenosa com solução de glicose a 5% (Glicose; 0,5g/kg de PV; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas) ou com solução fisiológica (Salina; 0,9% NaCl; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas)

Tratamento	BEN	BEP
Glicose	1,09 ± 0,11 ^{a,c}	0,62 ± 0,10 ^{b,c}
Salina	0,72 ± 0,11 ^{a,d}	0,95 ± 0,10 ^{a,d}

(a,b): Letras distintas nas linhas referem-se a diferenças significativas (P <0,05)

(c,d): Letras distintas nas colunas referem-se a diferenças significativas (P <0,05)

No início do jejum, as concentrações séricas de P4 foram maiores (Tabela 2) em vacas em BEN comparadas às vacas em BEP. Foi detectada uma interação entre balanço energético e infusão. Vacas em BEN, recebendo salina, tiveram maior concentração sérica média de P4 do que vacas recebendo glicose (Tabela 6), enquanto não houve efeito de infusão para vacas em BEP.

Tabela 6. Concentração sérica média de P4 (ng/mL) pós-infusão em vacas não lactantes infundidas via intravenosa com solução de glicose a 5% (Glicose; 0,5g/kg de PV; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas) ou com solução fisiológica (Salina; 0,9% NaCl; solução administrada, na média, em 36 mL/min durante período de 3 horas)

Tratamento	BEN	BEP
Glicose	1,44 ± 0,10 ^{a,c}	1,60 ± 0,10 ^{a,c}
Salina	1,83 ± 0,10 ^{a,d}	1,54 ± 0,10 ^{b,c}

(a,b): Letras distintas nas linhas referem-se a diferenças significativas (P = 0,06)

(c,d): Letras distintas nas colunas referem-se a diferenças significativas (P <0,05)

4. Discussão

Vacas em BEN perderam mais PV e ECC em relação às vacas em BEP, o que era esperado devido as diferenças na ingestão de nutrientes e consequente estado nutricional de vacas em BEN e BEP.

Antes da infusão dos tratamentos, as concentrações séricas de glicose não diferiram entre vacas em BEN e BEP. As concentrações séricas de glicose em bovinos são dependentes de gliconeogênese hepática dos ingredientes da dieta depois da digestão (Young, 1977), particularmente o propionato originado da fermentação do rúmen (Huntington, 1997; Reynolds et al., 1994; Reynolds, 2005). Entretanto, bovinos em inadequado estado nutricional podem utilizar outros substratos gliconeogênicos, tais como aminoácidos endogênicos e glicerol proveniente de ácidos graxos e também aumentar a gliconeogênese para compensar as deficiências nutricionais e prevenir significantes decréscimos na circulação de glicose, sendo que a glicose é essencial para a manutenção e para as funções produtivas de ruminantes (Huntington, 1997), o que pode explicar as concentrações semelhantes de glicose, independentemente do BE.

Resultados de Vieira et al. (2010) estão de acordo com o presente experimento, pois vacas infundidas com glicose tiveram maiores concentrações séricas de glicose às 3 horas relativas ao início da infusão do que vacas recebendo salina, independentemente de estado nutricional. Outros autores também relataram maiores concentrações séricas de glicose em vacas leiteiras recebendo infusão intravenosa de glicose comparadas a grupos recebendo salina, independentemente do estado nutricional (Subiyatno et al., 1996; Al-trad et al., 2009).

As concentrações séricas de insulina antes da infusão de tratamentos foram semelhantes para vacas em BEN e BEP, apesar das concentrações séricas de insulina estarem associadas à ingestão de nutrientes (Vizcarra et al., 1998; Bossis et al., 2000; Lapierre et al., 2000), insulina é sintetizada e secretada principalmente em resposta às concentrações de glicose (Nussey & Whitehead, 2001).

Após a infusão dos tratamentos, vacas que receberam infusão intravenosa de glicose tiveram maiores concentrações séricas de insulina às 3 horas do que vacas que receberam salina, o que está de acordo com Vieira et al. (2010).

Entretanto, vacas em BEN recebendo glicose tiveram maiores concentrações séricas de insulina às 3 horas do que vacas em BEP recebendo glicose. Vieira et al. (2010) observaram que vacas em BEN conseguiram manter a concentração de

insulina alta por mais tempo comparadas às vacas em BEP, ainda Hove (1978) observou comportamento bifásico na curva de insulina com pico máximo dentro de 20 minutos depois do começo da infusão de glicose, sendo seguido pela sustentação da elevação nas concentrações séricas de insulina em vacas normais; em vacas sofrendo restrição alimentar, somente a fase posterior foi detectada, sugerindo que, talvez, os resultados do presente experimento podem ser devido ao momento do pico. Entretanto, novas pesquisas são necessárias para avaliar esta questão.

Expressão de RNAm de GHR1A foi igual para vacas em BEN e BEP, apesar das diferenças na ingestão de nutrientes e mudanças no ECC e PV. Os receptores de GH são encontrados em muitos tecidos, sendo o fígado o lugar de maior abundância (Lucy et al., 1998). Além do RNAm de GHR1A ser expresso exclusivamente em fígado bovino adulto (Lucy et al., 1998), é a maior das três variantes (GHR1A, GHR1B e GHR1C) de GHR, que normalmente representa 50% do total de mRNA GHR no fígado de bovinos (Jiang & Lucy 2001).

A expressão de GHR e RNAm de IGF-1 no fígado é sensível (responsivo) ao estado nutricional (Bornfeldt et al., 1989; Pell et al., 1993) e ao estado fisiológico (Kobayashi et al., 1999). Segundo Butler et al. (2003), durante situações de baixa insulina plasmática, incluindo períodos de BEN, a expressão de GHR e IGF-1 é reduzida. No presente trabalho, as concentrações séricas de insulina antes da infusão foram as mesmas para vacas em BEN e BEP, o que pode explicar expressão semelhante de RNAm de GHR1A entre diferentes BE.

McCarthy et al. (2009), observaram redução de RNAm de GHR1A durante o meio da lactação em comparação ao início da lactação, porém as vacas estavam em melhor condição de BE no dia 140 comparado às vacas no dia 35 pós-parto. Lucy et al. (2001, 2009), analisaram biópsias de fígado no dia do parto e ao longo da lactação, e observaram aumento substancial de GHR1A com o avanço no estágio de lactação. Entretanto, Rhoads et al. (2008), não observaram mudança na expressão de RNAm de GHR1A no fígado de vacas leiteiras entre o dia 40 e 160 pós-parto.

Por outro lado, os níveis de RNAm de GHR1A nem sempre refletem a abundância da proteína de GHRs (McCarthy, et al., 2009). Rhoads et al. (2007) observaram reduzida proteína de GHR sem corresponder a redução de RNAm de GHR1A no fígado em vacas nutricionalmente estressadas, o que também pode ter acontecido no presente estudo.

Ainda, o declínio na expressão de GHR1A parece ser específico para vacas leiteiras, pois não ocorre mudança no GHR1A em vacas de corte (Jiang et al., 2005), o

que pode explicar os resultados desse experimento, uma vez que foram utilizadas vacas secas e mestiças Holandês/Gir.

O mecanismo, proposto por Butler et al. (2003), é que hiperinsulinemia aumenta GHR no fígado, estes autores observaram que após a infusão de glicose, vacas em BEN tiveram maior expressão de GHR1A, enquanto vacas BEP tiveram redução na expressão de GHR1A. Butler et al. (2003) demonstraram que, em vacas em início de lactação e consequente BEN, houve redução da expressão hepática de RNAm de GHR1A e IGF-1 em vacas recebendo salina (controle), mas foi aumentada em 3,6 vezes e 6,3 vezes, respectivamente, em vacas recebendo infusão intravenosa de insulina, o que está de acordo com o presente trabalho.

Observou-se menor expressão de GHR1A após a infusão de glicose em vacas em BEP, de acordo com McCarthy et al. (2009), para vacas entre o dia 35 e 140 pós-parto, foi observada menor expressão de GHR1A com aumento de BE. Segundo Jiang et al. (2005), os mecanismos que causam declínio de GHR1A fora do período do parto são desconhecidos.

Antes da infusão de tratamentos, expressão de RNAm e concentração sérica de IGF-1 foi maior em vacas em BEN comparadas às vacas em BEP.

Restrição alimentar em vacas leiteiras aumentou (Bauman et al., 1979; Vicini et al., 1988; Lapierre et al., 1995) ou não afetou (DeBoer et al., 1989; McGuire et al., 1992), as concentrações séricas de GH. De maneira semelhante, restrição alimentar aumentou (Lapierre et al., 1992a) ou não afetou (Elsasser et al., 1989) a resposta nas concentrações séricas de GH pelo GRF (Fator de liberação de GH). O grau da restrição alimentar é provavelmente um dos maiores efeitos nas diferenças observadas (Lapierre et al., 1995).

Talvez, no presente experimento, vacas em BEN apresentaram maiores concentrações séricas de GH comparadas às vacas em BEP, o que pode explicar maior expressão de RNAm e concentração sérica de IGF-1 às 0 h no grupo em BEN, já que a expressão de GHR1A foi a mesma para os diferentes BE e as ações fisiológicas de GH são iniciadas quando GH se liga aos receptores de GH em células-alvo. No fígado, local de maior abundância de GHR, a ligação do GH ao GHR-1A inicia a síntese e secreção de IGF-I (Roche et al., 2009).

Vacas recebendo infusão intravenosa de salina tiveram menores concentrações séricas de IGF-1 às 6 horas relativas ao início da infusão do que vacas recebendo glicose, o que pode ser explicado devido ao período prolongado de jejum, totalizando, às 6 horas pós-infusão, jejum de 18 horas.

Antes da infusão dos tratamentos, expressão de RNAm de CYP2C e CYP3A foi semelhante para vacas em BEN e BEP, o que pode ser explicado devido a semelhantes concentrações séricas de insulina neste momento (Lemley et al., 2008a). Não houve efeito pós-infusão para expressão de RNAm de CYP2C. O que pode explicar as concentrações séricas de P4 em vacas em BEP, já que CYP2C é a enzima que mais contribui para inativação hepática de P4 em vacas (Lemley & Wilson, 2010).

Para vacas em BEP, infusão intravenosa de glicose reduziu expressão de CYP3A, o que era esperado. Enquanto que, para vacas em BEN, infusão de glicose aumentou expressão de CYP3A, o que foi inesperado e necessita maiores investigações, uma vez que maiores níveis de insulina diminuem a expressão desta enzima em bovinos (Lemley et al., 2008a; Lemley et al., 2010).

Lemley et al. (2008a), observaram que mesmo com aumento de 30% de insulina para vacas que recebiam PPG e melhora no BE, expressão de RNAm de CYP2C em vacas recebendo água ou PPG não diferiu entre os tratamentos, entretanto, vacas recebendo PPG tiveram redução de 40% na quantidade de RNAm de CYP3A. No mesmo trabalho, durante administração de insulina (1,0 µg/insulina/Kg PV/h por 96 horas), houve aumento de aproximadamente 9 vezes (2,33 vs. 0,27 ng/mL) nas concentrações de insulina e redução na expressão de RNAm de CYP2C e CYP3A e diminuição de 88 e 45% na atividade de CYP2C e CYP3A comparado ao grupo controle.

Estes resultados podem sugerir que, para ocorrer diminuição na expressão de RNAm de CYP2C, seja necessário maior concentração de insulina e/ou desafio mais longo do que foi observado no presente experimento.

In vitro, Smith et al. (2006) observaram diminuição na degradação de P4 em linhagem de hepatócitos de ratos cultivados com aumento na concentração de insulina. Lemley (2007) demonstrou que as mesmas células de hepatócitos, cultivadas sob idênticas condições experimentais, tiveram atividades diminuídas de CYP2C e CYP3A após um desafio de 4 horas de insulina, o que é congruente com a diminuição observada nas concentrações de P4.

Entretanto, apesar de alguns estudos demonstrarem que em ovelhas ovariectomizadas e vacas leiteiras alimentadas com dietas que estimulam a secreção de insulina houve diminuição na atividade e/ou expressão de CYP 2C e/ou CYP 3A, não houve diferença no catabolismo de P4 (Lemley et al., 2008a; Lemley et al., 2008b; Lemley et al., 2010).

Adicionalmente, no presente estudo, vacas receberam infusões de glicose somente uma vez durante o experimento e o aumento nas concentrações séricas de insulina foi agudo, mas temporário, considerando que nos citados estudos as infusões de insulina são administradas continuamente durante período de 4 dias (Butler et al., 2003; Lemley et al., 2008a) e a administração diária de PPG fornecida por 35 dias (Butler et al., 2006; Lemley et al., 2008a) antes das coletas de amostras do fígado.

Vieira et al. (2010) observaram diminuição no catabolismo de P4 em vacas em BEP com altas concentrações séricas de insulina, sugerindo diminuição na expressão e/ou atividade de CYP2C e CYP3A. Talvez, os níveis de insulina necessários para alterar CYP2C e CYP3A, e alterar as concentrações séricas de P4 no grupo em BEP, sejam maiores do que o observado no presente experimento. Não houve alteração da enzima CYP2C, o que pode explicar a inalteração dos níveis de P4 em vacas em BEP neste experimento, já que esta enzima é a mais importante na inativação de P4 em vacas leiteiras (Lemley & Wilson, 2010).

No início do jejum, as concentrações séricas de P4 foram maiores em vacas em BEN em comparação às vacas em BEP, o que está de acordo com estudos de Vieira et al. (2010) e Rodrigues et al. (2011). As vacas utilizadas no presente estudo eram ovariectomizadas e, portanto, a principal fonte de circulação de P4 foi o CIDR, além disso, os animais passaram por jejum de 12 horas antes das infusões dos tratamentos para eliminar os efeitos da ingestão de alimento nas concentrações séricas de P4 (Vasconcelos et al., 2003).

As diferenças nas concentrações séricas de P4 entre vacas em BEN e BEP antes da infusão dos tratamentos podem ser atribuídas a vários fatores. Vacas em BEP tiveram maior ingestão de alimento comparadas às vacas em BEN, considerando que maior ingestão de alimento leva a maior fluxo de sangue no fígado e, consequentemente maior catabolismo hepático de P4 (Sangsritavong et al., 2002). A glândula supra-renal é capaz de sintetizar quantidades significativas de P4 como um intermediário da síntese de corticóide quando estimulado por fatores estressantes (O'Connor et al., 2000), e restrição alimentar pode aumentar a síntese adrenal de cortisol (Murayama et al. 1986; Ward et al, 1992;. Henricks et al, 1994), e, talvez, a produção P4 pela adrenal (Cooke & Arthington, 2009). Por outro lado, Rodrigues et al. (2011) observaram que não existem correlações significativas entre cortisol e P4 em vacas perdendo peso. Além disso, P4 é armazenada no tecido adiposo e pode ser liberada para a circulação quando a gordura corporal é mobilizada (Hamudikuwanda et al., 1996; Rodrigues et al., 2011).

Vacas em BEN, recebendo infusão intravenosa de salina, tiveram concentração sérica média de P4 maior do que vacas recebendo glicose. Pesquisas anteriores demonstraram que a circulação de AGNEs em vacas leiteiras lactantes e não-lactantes recebendo precursores de glicose, tais como PPG, diminuiu particularmente quando vacas estavam em BEN (Christensen et al., 1997; Butler et al., 2006). Neste mesmo sentido, Madureira et al. (2011) observaram que vacas em BEN recebendo PPG tiveram diminuição nas concentrações séricas de P4 das 0,5 às 3 horas depois da administração de PPG, porém vacas em BEP não, sugerindo que a mobilização de gordura diminuiu devido à administração de PPG, o que pode ter acontecido no presente trabalho.

Para vacas em BEN recebendo glicose houve diminuição na concentração sérica média de P4, o que pode ser explicado pelo aumento na expressão de CYP3A, sugerindo maior catabolismo de P4 neste grupo.

Era esperado que vacas em BEP recebendo infusão intravenosa de glicose tivessem maiores concentrações de P4, porém não houve efeito de infusão em vacas BEP. Vieira et al. (2010) observaram aumento nas concentrações séricas de P4 em vacas em BEP recebendo infusão intravenosa de glicose, porém as concentrações séricas de insulina destas vacas alcançaram aproximadamente 220 μ IU/mL, sendo que, no presente experimento, vacas em BEP alcançaram aproximadamente 50 μ IU/mL de concentração sérica máxima de insulina. Talvez, para que ocorra diminuição no catabolismo de P4, seja necessário alcançar maiores níveis de concentração sérica de insulina do que os observados neste experimento.

5. Conclusões

Os efeitos de infusão intravenosa de glicose nas concentrações séricas de insulina, P4 e expressão de CYP3A, em vacas ovariectomizadas e secas recebendo dispositivo intravaginal de P4, foram dependentes do BE.

Vacas em BEN recebendo glicose tiveram maiores concentrações séricas de insulina comparadas às vacas em BEP.

O aumento temporário nas concentrações séricas de insulina aumentou expressão de CYP3A e reduziu concentrações séricas de P4 em vacas em BEN, por outro lado, reduziu expressão de CYP3A em vacas em BEP, o que não foi suficiente para alterar as concentrações séricas de P4 neste grupo.

6. Referências Bibliográficas

- Al-Trad, B., K. Reisberg, T. Wittek, G. B. Penner, A. Alkaassem, G. Gabel, M. Furl, J. R. Aschenbach. 2009. Increasing intravenous infusions of glucose improve body condition but not lactation performance in midlactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92: 5645-5658.
- Armstrong, D. G., J. G. Gong, R. Webb. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. 2003. *Reprod. Suppl.* 61: 403 – 414, 2003.
- Bauman, D. E., R. M. Akers, L. T. Chapin, H. A. Tucker, and E. M. Convey. 1979. Effect on intake on serum concentrations of prolactin and growth hormone in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 62(Suppl. 1): 14 (Abstr).
- Bornfeldt, K. E., H. J., Arnqvist, B., Enberg, L. S., Mathews, and G., Norstedt. 1989 Regulation of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor gene expression by diabetes and nutritional state in rat tissues. *Journal of Endocrinology* 122 651–656.
- Bossis, I., R. P. Wettemann, S. D. Welty, J. Vizcarra, and L. J. Spicer. 2000. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: Ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. *Biol. Reprod.* 62:1436–1444.
- Butler, S. T., A. L. Mar, S. H. Pelton, R. P. Radcliff, M. C. Lucy, W. R. Butler. 2003. Insulin Restores GH Responsiveness During Lactation-Induced Negative Energy Balance In Dairy Cattle: Effects On Expression Of IGF-I And GH Receptor 1A. *J. Endocrinol.* 176: 205–217.
- Butler, W.R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 60:61: 449–457.
- Butler, W.R. Inhibition of ovulation in the postpartum cow and the lactating sow. 2005. *Livest. Prod. Sci.* 98: 5 –12.

- Butler, S. T., S. H. Pelton, W. R. Butler. 2006. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *J. Dairy. Sci.* 89: 2938-2951.
- Chagas, L. M., J. J. Bass, D. Blache, C. R. Burke, J. K. Kay, D. R. Lindsay, M. C. Lucy, G. B. Martin, S. Meier, F. M. Rhodes, J. R. Roche, W. W. Thatcher, and R. Webb. 2007. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:4022–4032.
- Christensen, J. O., R. R. Grummer, F. E. Rasmussen, S. J. Bertics. 1997. Effect of method of delivery of propylene glycol on plasma metabolites of feed-restricted cattle. *J. Dairy Sci.* 80: 563-568.
- Cooke, F.R., and D.J. Arthington. Plasma Progesterone Concentrations as Puberty for Brahman-crossbred heifers. 2009. *Livest. Sci.* 123: 101 – 105.
- DeBoer, G., and J. 1. Kennelly. 1989. Effect of somatotropin injection and dietary protein concentration on milk yield, and kinetics of hormones in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:419.
- Elsasser T. H., T. S. Rumsey, and A. C. Hammond. 1989. Influence of diet on basal and growth hormonestimulated plasma concentrations of IGF-I in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 67:128.
- Fouladi-Nashta, A. A., C. G. Gutierrez, P. C. Garnsworthy, R. Webb. 2005. Effects of dietary carbohydrate source on oocyte/embryo quality and development in high yielding lactating dairy cattle. *Biol. Reprod.* 70 (Special Edition 1): Abstr. 244.
- Gong, J. G.; W. J. Lee, P. C. Garnsworthy, R. Webb. 2002. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction.* 123: 419-427.
- Gonzalez-Padilla, E. J. N. Wiltbank, G. D. Niswender. 1975. Puberty in beef heifers. The interrelationship between pituitary, hypothalamic and ovarian hormones. *J. Anim. Sci.* 40:1091-1104.

- Hasler, J. F., R. A. Bowen, L. D. Nelson, and G. E. Seidel, Jr. 1980. Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfers. *J. Reprod. Fert.* 58: 71 – 77.
- Hauser, S. D., M. F. Mcgrath, R. J. Collier, G.G. Krivi. 1990. Cloning and in vivo expression of bovine growth hormone receptor mRNA. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 72: 187 – 200.
- Henricks, D. M., T. C. Jenkins, J. R. Ward, C. S. Krishnan, L Grimes. 1994. Endocrine responses and body composition changes during feed restriction and realimentation in young bulls. *J. Anim. Sci.* 72: 2289-2297.
- Hamudikuwanda, H., G. Gallo, E. Block, B. R. Downey. 1996. Adipose tissue progesterone concentrations in dairy cows during late pregnancy and early lactation. *Anim. Reprod. Sci.* 43: 15–23.
- Huntington, G. B. 1997. Starch utilization by ruminants from basics to the bunk. *J. Anim. Sci.* 75: 852-867.
- Inskeep, E. K., and R. A. Dailey. 2005. Embryonic death in cattle. *Vet. Clin. Food Anim.* 21:437–461.
- Janovick-Guretzky, N. A., H. M. Dann, D. B. Carlson, M. R. Murphy, J. J. Loor, J. K. Drackley. 2007. Housekeeping Gene Expression in Bovine Liver is Affected by Physiological State, Feed Intake, and Dietary Treatment. *J. Dairy Sci.* 90: 2246–2252.
- Jiang, H., M. C. Lucy, B. A. Crooker, W. E Beal. 2005. Expression of Growth Hormone Receptor 1A mRNA is Decreased in Dairy Cows but not in Beef Cows at Parturition. *J. Dairy Sci.* 88: 1370–1377.
- Jiang, H., and M. C. Lucy. 2001. Variants of the 5'- untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation expression and effects on translation efficiency. *Gene*. 265: 45 – 53.

- Jolly, P.D., S. McDougall, L.A., Fitzpatrick, K.L., Macmillan, K., Entwistle. 1995. Physiological effects of undernutrition on postpartum anestrous in cows. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 49: 477–492.
- Lapierre, H., J. F. Bernier, P. Dubreuil, C. K. Reynolds, C. Farmer, D. R. Ouellet, and G. E. Lobley. 2000. The effect of feed intake level on splanchnic metabolism in growing beef steers. *J. Anim. Sci.* 78:1084–1099.
- Lapierre, H., G. Pelletier, T. Abribat, K. Fournier, P. Gaudreau, P. Brazeau, and D. Petitclerc. 1995. The Effect of Feed Intake and Growth Hormone-Releasing Factor on Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci* 78:804-815.
- Lapierre H., C. K. Reynolds, T. H. Elsasser, P. Gaudreau, P. Brazeau, and H. F. Tyrrell. 1992a. Effects of growth hormone-releasing factor and feed intake on energy metabolism in growing beef steers: net hormone metabolism by portal-drained viscera and liver. *J. Anim. Sci.* 70:742.
- Lapierre H., C. Fanner, C. Girard, and P. Brazeau. 1992b. Effect of age and intake on growth hormone kinetics in dairy heifers. *Domest. Anim. Endocrinol.* 9:199.
- Lemley, C. O. 2007 Alterations in progesterone catabolic enzymes by insulin. Tese de Mestrado. West Virginia University, Morgantown.. Disponível em: <https://eidr.wvu.edu/etd/documentdata.eTD?documentid=5286>. Acesso em 10/03/2011.
- Lemley, C.O., S.T. Butler, W.R. Butler, M.E. Wilson. 2008a. Short Communication: Insulin Alters Hepatic Progesterone Catabolic Enzymes Cytochrome P450 2C and 3A in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 91: 641-645.
- Lemley, C. O., J. M. Koch, K. P. Blemings, K. M Krause., M. E. Wilson. 2008b. Concomitant changes in progesterone catabolic enzymes, cytochrome P450 2C and 3A, with plasma insulin concentrations in ewes supplemented with sodium acetate or sodium propionate. *Animal.* 2:8: 1223–1229.

- Lemley, C. O., T. A. Wilmoth, L. R. Tager, K. M. Krause, M. E. Wilson. 2010. Effect of a high cornstarch diet on hepatic cytochrome P450 2C and 3A activity and progesterone half-life in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93: 1012–1021, 2010.
- Lemley, C. O., M. E. Wilson. 2010. Effect of cytochrome P450 and aldo-keto reductase inhibitors on progesterone inactivation in primary bovine hepatic cell cultures. *J. Dairy Sci.* 93: 4613–4624.
- Leroy, J. L. M. R., A. Van Soom, G. Opsomer, I. G. F. Goovaerts, and P. E. J. Bols. 2008. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part II. *Reprod. Domest. Anim.* 43:623–632.
- Littell, R. C., P. R. Henry, C. B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76:1216–1231.
- Looper, M. L., C. A. Lents, R. P. Wettemann. 2003. Body condition at parturition and postpartum weight changes do not influence the incidence of short-lived corpora lutea in postpartum beef cows. *J. Anim Sci.* 81: 2390–2394.
- Lopes, N.C., B.A. Scarpa, I.B. Cappellozza, F.R. Cooke, M.L.J. Vasconcelos. 2009. Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. *J. Anim. Sci.* 87:3935-3943.
- Lucy, M. C., C. K. Boyd, A. T. Koenigsfeld, C. S. Okamura. 1998. Expression of somatotropin receptor messenger ribonucleic acid in bovine tissues. *J. Dairy Sci.* 81: 889–1895.
- Lucy, M. C., H. Jiang, Y. Kobayashi. 2001. Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. *J. Dairy Sci.* 84(E Suppl.): E113–E119.
- Lucy, M. C., G. A. Verkerk, B. E. Whyte, K. A. Macdonald, L. Burton, R. T. Cursons, J. R. Roche, C. W. Holmes. 2009. Somatotropic axis components and nutrient

partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in a pasture system. *J. Dairy Sci.* 92: 526–539.

Kobayashi, Y., C. K. Boyd, C. J. Bracken, W. R. Lamberson, D. H. Keisler, and M. C. Lucy. 1999. Reduced Growth Hormone Receptor (GHR) Messenger Ribonucleic Acid in Liver of Periparturient Cattle Is Caused by a Specific Down-Regulation of GHR 1A That Is Associated with Decreased Insulin-Like Growth Factor I. *Endocrinol.* 140(9):3947-3954.

Machado, M. F., V. M. Portela, C. A. Price, I. B. Costa, P. Ripamonte, R. L. Amorim, J. Jr. Buratini. 2009. Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. *J. Endocrinol.* 202: 347–353.

Madureira, A. M. L., M. A. S. Borges, R. O. Rodrigues, R. F. Cooke, J. L. M. Vasconcelos. 2011. Effects of propiogenic supplements on serum concentration of insulin and progesterone in nonlactating cows: II. Propylene glycol. In: *Join Anual Meeting ADSA/ASAS, 2011, New Orleans – LO.* *J. Dairy Sci.* 94: supplement 1: 340.

Mccarthy, S. D., S. T. Butler, J. Patton, M. Daly, D. G. Morris, D. A. Kenny, S. M. Waters. 2009. Differences in the expression of genes involved in the somatotropic axis in divergent strains of Holstein-Friesian dairy cows during early and mid lactation. *J. Dairy Sci.* 92: 5229–5238.

McGuire, M. A., D. E. Bauman, M. A. Miller, and G. F. Hartnel. 1992. Response of somatomedins (IGF-I and IGF-II) in lactating cows to variations in dietary energy and protein and treatment with recombinant nmethionyl bovine somatotropin. *J. Nutr.* 122:128.

Monget, P., and G.B. Martin. 1997. Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Human Reproduction.* 12: 33–52.

Moriel, P., T.S. Scatena, O. G. Sá Filho, R.F. Cooke, J.L.M. Vasconcelos. 2008. Concentrations of Progesterone and Insulin in Serum of Nonlactating Dairy

- Cows in Response to Carbohydrate Source and Processing. *J Dairy Sci.*, 91: 4616-4621.
- Murayama, S., K. Moriya, Y. Saaki. 1986. Changing pattern of plasma cortisol level associated with feeding in sheep. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 57: 317–323.
- Murray, M. 1991. Microsomal cytochrome P450-dependent steroid metabolism in male sheep liver. Quantitative importance of 6 β -hydroxylation and evidence for the involvement of a P450 from the IIIA subfamily in the pathway. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 38: 611–619.
- Murray, M. 1992. Participation of a cytochrome P450 enzyme from the 2C subfamily in progesterone 21-hydroxylation in sheep liver. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43: 591–593.
- Nussey, S. S., S. A., Whitehead. *Endocrinology: An integrated approach*. BIOS Scientific, Oxford, U.K, 2001.
- O'connor, T. M., D. J. O'halloran, F. Shanahan. 2000. The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *Q. J. Med.*, 93: 323-333.
- Pell J. M., J. C., Saunders, and R. S., Gilmour. 1993. Differential regulation of transcription initiation from insulin-like growth factor-I (IGF-I) leader exons and of tissue IGF-I expression in response to changed growth hormone and nutritional status in sheep. *Endocrinology* 132 1797–1807.
- Pescara, J. B. et al. Effect of finely ground corn intake after fixed-time artificial insemination on serum progesterone concentrations and conception rates of grazin beef cows. 2009. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* (Submetido). Belo Horizonte/MG.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29: 2002-2007.

- Ramakers, C., J. M. Ruijter, R. H. Deprez, A. F. Moorman. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*. 339: 62-66.
- Reynolds, C. K. 2005. Glucose balance in cattle. Florida Ruminant Nutrition Symposium. Disponível em: <http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2005/Reynolds.pdf>. Acesso em 10/03/2011.
- Reynolds, C. K., D. L Harmon, M. J. Cecava. 1994. Absorption and delivery of nutrients for milk protein synthesis by portal-drained viscera. *J. Dairy Sci.* 77: 2787-2808.
- Rhoads, R. P., J. W. Kim, M. E. Van Amburgh, R. A. Ehrhardt, S. J. Frank, Y. R. Boisclair. 2007. Effect of nutrition on the GH responsiveness of liver and adipose tissue in dairy cows. *J. Endocrinol.* 195:49–58.
- Rhoads, M. L., J. P. Meyer, W. R. Lamberson, D. H. Keisler, M. C. Lucy. 2008. Uterine and hepatic gene expression in relation to days postpartum, estrus, and pregnancy in postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91: 140–150.
- Roche, J.F., D. Mackey, and M.D. Diskin. 2000. Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci.* 60:6:703 – 712.
- Roche, J. R. , N. C. Friggens , J. K. Kay , M. W. Fisher ,K. J. Stafford, and D. P. Berry. 2009. *Invited review*: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J. Dairy Sci.* 92 :5769–5801.
- Rodrigues, R. O., C. Trevisanuto, R. F. Cooke, J. L. M. Vasconcelos. 2011. Effects of body weight loss on serum progesterone concentrations of non-lactating dairy cows. *Theriogenol.* 75: 131–137.
- Sangsritavong, S., D. K. Combs, R. Sartori, and M. C. Wiltbank. 2002. High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:2831-2842.

- Schillo, K. K., J. B. Hall, and S. M. Hileman. 1992. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *J. Anim. Sci.* 70:3994-4005.
- Smith, D. L., B. M. Stinefelt, K. P. Blemings, M. E. Wilson. 2006. Diet-induced alterations in progesterone clearance appear to be mediated by insulin signaling in hepatocytes. *J. Anim. Sci.* 84: 1102–1109.
- Spencer, T. E., and F. W. Bazer. 2002. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front. Biosci.* 7: 1879-1898.
- Spicer, L. J., W. B. Tucker, and G. D. Adams. 1990. Insulin-Like Growth Factor-I in Dairy Cows: Relationships Among Energy Balance, Body Condition, Ovarian Activity, and Estrous Behavior. *J Dairy Sci* 13: 929-931.
- Spicer, L.J., and S.E. Echternkamp. 1995. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.* 12: 223-245.
- Subiyatno, A., D. N. Mowat, W. Z. Yang. 1996. Metabolite and hormonal responses to glucose or propionate infusions in periparturient dairy cows supplemented with chromium. *J. Dairy Sci.* 79: 1436-1445.
- Vandehaar, J., B. K. Sharma, and R. L. Fogwell. 1995. Effect of Dietary Energy Restriction on the Expression of Insulin-like Growth Factor-I In Liver and Corpus Luteum of Heifers. *J Dairy Sci* 78:832-841.
- Vasconcelos, J. L. M., S. Sangsritavong, S. J. Tsai, M. C. 2003. Wiltbank Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenol.* 60: 795-807.
- Vicini, J. L., W. S. Cohick, H. Clark, S. N. McCutcheon, and D. E. Bauman. 1988. Effect of feed intake and sodium bicarbonate on milk production and concentrations of hormones and metabolites in plasma of cows. *J. Dairy Sci.* 71:1232.

- Villa-Godoy, A., T. L. Hughes R. S. Emery W. Enright A. D. Ealy S. A. Zinn, and R. L. Fogwell. 1990. Energy balance and body condition influence luteal function in Holstein heifers. *Domest. Anim. Endocrinol.* 7:135.
- Vieira, F. V. R., C. N. Lopes, B. I. Cappelozza, A. B. Scarpa, R. F. Cooke, J. L. M. Vasconcelos. 2010. Effects of intravenous glucose infusion and nutritional balance on serum concentrations of NEFA, glucose, insulin, and progesterone in non-lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93: 3047–3055.
- Vizcarra, J. A., R. P. Wettemann, J. C. Spitzer, and D. G. Morrison. 1998. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin, and nonesterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. *J. Anim. Sci.* 76:927–936.
- Ward, J. R., D. M. Henricks, T. C. Jenkins, W. C. Bridges. 1992. Serum hormone and metabolite concentrations in fasted young bulls and steers. *Domest. Anim. Endocrinol.* 9: 97-103.
- Wettemann, R. P, C. A. Lents, N. H. Ciccioli, F. J. White and I. Rubio, 2003. Nutritional- and suckling-mediated anovulation in beef cows. *J. Anim. Sci.* 81:E48-E59.
- Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Boman, H. F. Troutt., T. N. 1982. Lesch A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65: 495–501.
- Young, J. W. 1977. Gluconeogenesis in cattle: Significance and methodology. *J. Dairy Sci.* 60: 1-15.
- .

CAPÍTULO 3

Conclusões Gerais e Implicações

Conclusões Gerais e Implicações

A hipótese: infusão intravenosa de glicose aumenta as concentrações séricas de insulina em vacas em BEN e BEP, e diminui a expressão de RNAm das enzimas hepáticas CYP2C e CYP3A, responsáveis pelo catabolismo de P4 apenas em vacas em BEP, foi parcialmente aceita.

Vieira et al. (2010) observaram diminuição no catabolismo de P4 em vacas em BEP com altas concentrações de insulina sérica, sugerindo diminuição na atividade de CYP2C e CYP3A. Porém, no presente estudo, não foi observada alteração nas concentrações séricas de P4 em vacas em BEP, que apesar de alcançarem altas concentrações séricas de insulina, estas foram cerca de 4,5 vezes menor em comparação ao citado estudo.

Considerando que em diversos estudos as infusões de insulina são administradas continuamente antes das biopsias de fígado, talvez, os níveis de insulina necessários para alterar CYP2C em vacas em BEP e, conseqüentemente alterar as concentrações séricas de P4 devam ser maiores do que os observados no presente experimento, o que, normalmente, não é verificado na resposta fisiológica natural de bovinos.

Para vacas em BEN recebendo glicose, foi observada menor concentração sérica média de P4, o que pode ser explicado pelo aumento na expressão de CYP3A e, conseqüentemente maior catabolismo de P4, ou, talvez, pela menor mobilização de gordura (Christensen et al., 1997; Butler et al., 2006; Madureira et al. 2011; Rodrigues et al., 2011).

Vacas com menor ECC (Spicer et al., 1990) têm menores concentrações de LH (Jolly et al., 1995), menor folículo dominante (Roche et al., 2000), menor corpo lúteo (Vanderhaar et al. 1995) e menor concentração sérica de P4 (Spicer et al., 1990, Villa-Godoy et al., 1990; Butler, 2000; Roche et al., 2000), porém Hasler et al. (1980) observaram que o tamanho do corpo lúteo não influenciou nas concentrações séricas de P4, sugerindo que, talvez, existam outros mecanismos na diminuição das concentrações séricas de P4.

Estes mecanismos fisiológicos são importantes e requerem investigações futuras, pois as concentrações de insulina e P4 estão associadas à função reprodutiva em vacas leiteiras. Novas investigações são necessárias para entender melhor a associação entre nutrição na possível alteração das concentrações de insulina, enzimas que catabolizam P4 e P4 circulante.