

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFLUÊNCIA DA INGESTÃO ALIMENTAR NAS CONCENTRAÇÕES
PLASMÁTICAS DE INSULINA E PROGESTERONA, E NA EXPRESSÃO
DE ENZIMAS HEPÁTICAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE
PROGESTERONA EM OVELHAS PRÉ-PÚBERES

FERNANDA COSTA SOUSA ZINSLY DE MATTOS

BOTUCATU - SP

Julho, 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFLUÊNCIA DA INGESTÃO ALIMENTAR NAS CONCENTRAÇÕES
PLASMÁTICAS DE INSULINA E PROGESTERONA, E NA EXPRESSÃO
DE ENZIMAS HEPÁTICAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE
PROGESTERONA EM OVELHAS PRÉ-PÚBERES

FERNANDA COSTA SOUSA ZINSLY DE MATTOS

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de Estadual Júlio de Mesquita Filho (FMVZ-UNESP/Botucatu) para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Sartori Filho

BOTUCATU - SP

Julho, 2012

Nome do autor: Fernanda Costa Sousa Zinsly de Mattos

Título: Influência da ingestão alimentar nas concentrações plasmáticas de insulina e progesterona, e na expressão de enzimas hepáticas envolvidas no metabolismo de progesterona em ovelhas pré-púberes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (FMVZ-UNESP/Botucatu) para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Prof. Dr. Roberto Sartori Filho

Orientador e Presidente da Banca

Departamento: Zootecnia

Unidade: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP-ESALQ.

Prof. Dr. José Buratini Junior

Membro 1

Departamento: Fisiologia (Instituto de Biociências)

Unidade: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP/Botucatu/SP.

Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira

Membro 2

Departamento: de Apoio a Produção e Saúde Animal

Unidade: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP/Araçatuba/SP.

Aprovada em 17 de Julho de 2012.

Aos meus pais Paulo e Marília...

... Dedico!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus... muito obrigada por tudo!!!

Quero agradecer a toda minha família, em especial aos meus pais Marília e Paulo, aos meus irmãos Guilherme e Gustavo, e a minha avó Maria Elisa. Não tenho nem palavras para agradecer todo apoio, incentivo e paciência. Vocês são tudo para mim. Sem a base dessa família maravilhosa não estaria aqui hoje. Me espelho todos os dias em vocês para me tornar uma pessoa melhor em todos os aspectos, tanto na minha vida pessoal quanto profissional.

Ao Professor Roberto Sartori, pela sua dedicação e disposição em ensinar, pela sua amizade, apoio e incentivo sempre que necessitei.

Aos meus amigos de pós-graduação Amanda (Amandinha), Michele (Mi), Alexandre (Xande), José (Zé), Pedro (Pedrinho), Fernanda Lavinia (Fer), Ricardo (Xara), Maria Clara (Clarinha), Monique (Mo), Louise (Linda), Guilherme (Gui), Igor (Strogonof), Murilo (Titanic), Cris e Lilian. Tenho certeza de que nossa amizade será para sempre!!!! Serei eternamente grata a todos... Foi muito bom conviver e trabalhar com vocês nestes tres anos!!

Às minhas queridas amigas, Michele e Amandinha (minhas “co-orientadoras”), vocês foram essenciais para a minha vida de mestranda. Todos os nossos momentos foram inesquecíveis... sem a ajuda de vocês não teria conseguido chegar até aqui...

À Aurea, pela sua disposição em me ajudar sempre que solicitei. Sua ajuda foi essencial nas análises laboratoriais.

Às minhas queridas ovelhas Ziza, Lua, Cicatriz, 3077, 3041, 3061, 3040, 3074, 3058, 2969, 2966, 3057, 3003, 3078, 3016, 3031, 2964, 3035, 3070, 3010, 3071, 3028, 3045, 3063.

Aos alunos do Laboratório do Professor Coutinho, em especial, o Gustavo e a Marcela pela ajuda incansável sempre que precisei.

Ao Laboratório da Professora Eunice Oba (Unesp/Botucatu), pelas análises hormonais (insulina e progesterona).

À Fapesp e o Cnpq, pelo apoio financeiro.

Aos estagiários: Tito, Jéssica, Martinha, Mariana, Roberta e Rafael, com exceção do Tito, nenhum de vocês estavam aqui no período da parte prática desse experimento, entretanto todos vocês ajudaram de alguma forma. Muito obrigada!!! Jessica muito obrigada pela ajuda!!!

Aos professores que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse experimento: Ivanete Susin, Gerson Mourão, Aurea Canavessi, Luiz Lehmann Coutinho e Eunice Oba.

Ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FMVZ-UNESP, Botucatu, a todos os Professores e Funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e a todos os Professores e Funcionários do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP Piracicaba.

Às minhas queridas “irmãs”, Adriana, Julia, Nina, Marina, Mariana, Leticia, Nena, Maria Fernanda, Liginha, não tenho nem palavras para dizer o quanto meu amor é grande por vocês... “amigo é coisa para se guardar debaixo de sete chaves dentro do coração...”

À minha querida amiga Elaine por toda ajuda nas horas mais difíceis da minha vida.

À minha Tia Fátima, e as minhas primas Lili, Lala, Lorena e Marcela.

“As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.” (Clarice Lispector)

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. Introdução	5
REVISÃO DE LITERATURA	7
2. Influência da ingestão alimentar na reprodução de ruminantes	7
2.1 Hormônios e metabolismo	7
2.2 Efeitos na Reprodução	12
2.2.1. <i>Duração do estro</i>	12
2.2.2. <i>Estruturas ovarianas (CL e folículo)</i>	13
2.2.3 <i>Fertilidade</i>	14
3. INSULINA	15
4. ENZIMAS HEPÁTICAS	16
5. OBJETIVO	20
6. HIPÓTESES	20
7. MATERIAL E MÉTODOS	20
7.1 Animais e Dietas	20
7.2 Colheita de Amostras	22
7.3 Biopsias Hepáticas	24
7.4 Avaliação da expressão do RNAm	25
7.5 Dosagens Hormonais	29
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
9. RESULTADOS	32
10. DISCUSSÃO	42
11. CONCLUSÕES	44
12. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
14. TRABALHO CIENTÍFICO	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Comparação entre novilhas e vacas leiteiras no tamanho folicular e concentração hormonal – P ₄ e E ₂ . Adaptado de Sartori et al. (2004).....	11
TABELA 2. Ingredientes e composição da dieta oferecida aos ovinos.	22
TABELA 3. Sequência dos primers utilizados e tamanho dos fragmentos amplificados para avaliação dos genes alvo (<i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A4</i>) e constitutivos (<i>β-actina</i> , <i>PPIA</i> , <i>GAPDH</i> , <i>ATPase</i> , <i>RPL19</i>).	28
TABELA 4. Média dos quadrados mínimos ± EP do consumo diário alimentar (kg/animal/d) e ganho médio semanal de peso corporal (kg) para o grupo de dieta <i>ad libitum</i> e dieta restrita respectivamente, durante todo o período experimental (8 semanas).	32
TABELA 5. Média dos quadrados mínimos ± EP das concentrações circulantes de insulina (μUI/mL) coletadas antes (-0,5h) e após ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas que receberam dieta <i>ad libitum</i> (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal), durante todo o período experimental, sendo uma coleta realizada ao final da quarta semana e a outra ao final da oitava semana.	34
TABELA 6. Média dos quadrados mínimos ± EP das concentrações plasmáticas de P4 (ng/mL) coletadas antes (-0,5h) e após ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas submetidas à dieta <i>ad libitum</i> (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal), durante todo o período experimental, sendo uma coleta realizada ao final da quarta semana e a outra ao final da oitava semana.	37
TABELA 7. Expressão relativa de RNAm de <i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A4</i> , <i>AKR1C4</i> e <i>AKR1D1</i> às 4 h após o fornecimento de dieta <i>ad libitum</i> (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal) ao final da quarta e oitava semana experimental ¹	39

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Ilustração esquemática da produção e metabolismo da progesterona. (Milo Wiltbank, 2012 – no prelo)..... 9
- FIGURA 2.** Esquema da principal via fisiológica que pode produzir mudanças na fisiologia reprodutiva observadas em vacas leiteiras de alta produção em lactação (Adaptado de Wiltbank, 2006)..... 10
- FIGURA 3.** Relação entre produção de leite e duração do estro. A análise incluiu todas as ovulações simples (n = 350), exceto a primeira ovulação pós-parto. Produção média de leite: 10 dias antes do estro (LOPEZ et al., 2004). 13
- FIGURA 4.** Esquema geral da inativação da progesterona nos hepatócitos. Durante a primeira fase as enzimas envolvidas são Citocromo P450 2C (CYP2C), P450 3A (CYP3A) e Aldo Keto Redutase (AKR1C), e na segunda fase as enzimas uridina difosfato glucuronosiltransferase (UGT1A e UGT1B). Na primeira fase o metabólito conjugado é hidroxiprogesterona e após a segunda fase as UGTs conjugam o metabólito hidroxiprogesterona com o ácido glicurônico. Fonte: Lemley e Wilson (2010). 17
- FIGURA 5.** Esquema: Função das AKRs no metabolismo de progesterona. Fonte: Jinn et al. (2011). 18
- FIGURA 6.** Baias de alvenaria individuais onde as borregas foram manejadas na ESALQ, USP, Piracicaba, SP. 21
- FIGURA 7.** Esquema ilustrativo das colheitas de sangue, colocação do dispositivo intravaginal de P₄ e aplicação de prostaglandina (PGF₂α). 23
- FIGURA 8.** Esquema geral do período experimental. Durante o período de adaptação (15 d), os animais receberam fornecimento da mesma dieta, com ingestão diária de 3% de matéria seca por kg de PC. Após o período de adaptação, os animais foram aleatoriamente designados aos dois grupos experimentais baseados no fornecimento de alimento: dieta *ad libitum* (alimentação com ingestão diária de 3,8% de matéria seca por kg de PC) e dieta restrita (alimentação com ingestão diária de 2% de matéria seca por kg de PC). Após 4 e 8 semanas do início do fornecimento das dietas, no D0 foi realizada colheita de sangue de todos os animais. Neste mesmo momento (D0), após a colheita de sangue e aplicação de PGF₂α os animais receberam um dispositivo intravaginal de liberação de P₄ (CIDR; 0,33g), permanecendo com o dispositivo por 9 d. No D6 foi realizada outra aplicação de PGF₂α, e no D8 foram realizadas colheitas

de sangue nos seguintes intervalos: -0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 h em relação ao momento da oferta da dieta (0 hora).....	24
FIGURA 9. Esquema ilustrativo da anestesia local com lidocaína, incisão de aproximadamente 1 cm na pele com o bisturi, coleta das amostras de fígado utilizando a agulha de biopsia TRU-CUT, e amostra de fígado.	25
FIGURA 10. Extração total do RNA do tecido hepático.	26
FIGURA 11. Após a extração, a quantificação individual do RNA extraído de cada uma das amostras foi realizada pelo Nanodrop 2000.	26
FIGURA 12. Amostras individuais de RNA total extraídas do tecido hepático das borregas, em gel de agarose (1%).	27
FIGURA 13. Consumo diário de ração total de acordo com os tratamentos: Ad Libitum (3,8 % de matéria seca por Kg de peso corporal) e Restrita (2,0 % de matéria seca por Kg de peso corporal) durante o período experimental.....	33
FIGURA 14. Peso corporal (kg) durante as semanas experimentais dos animais recebendo dieta Ad Libitum (3,8 % de matéria seca por Kg de peso corporal) e Restrita (2,0 % de matéria seca por Kg de peso corporal).	33
FIGURA 15. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações séricas de insulina (μ UI/mL) durante o período de adaptação (15 dias; 3% de matéria seca por kg de peso corporal).	34
FIGURA 16. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações plasmáticas de insulina (μ UI/mL) realizadas antes (-0,5 h) e após a ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas submetidas à dieta <i>ad libitum</i> (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal) ao final das primeiras 4 semanas experimentais.	35
FIGURA 17. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações plasmáticas de insulina (μ UI/mL) realizadas antes (- 0,5h) e após a ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas submetidas à dieta <i>ad libitum</i> (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal) ao final do experimento (8 semanas).	36
FIGURA 18. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) realizadas antes (-0,5 h) e após a ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas submetidas à dieta <i>ad libitum</i> (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e	

dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal) ao final das primeiras 4 semanas experimentais.	37
FIGURA 19. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) realizadas antes (-0,5 h) e após a ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas submetidas à dieta <i>ad libitum</i> (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal) ao final do experimento (8 semanas).	38
FIGURA 20. Expressão relativa das enzimas hepáticas Citocromo P450 2C e 3A em borregas 4 semanas após o início dos tratamentos. Genes de referência: GAPDH, PPIA, ATPase, RPL19 e β -actina.	40
FIGURA 21. Expressão relativa das enzimas hepáticas AKR1C e AKR1D em borregas 4 semanas após o início dos tratamentos . Genes de referência: GAPDH, PPIA, ATPase, RPL19 e β -actina.	40
FIGURA 22. Expressão relativa das enzimas hepáticas Citocromo P450 2C e 3A em borregas 8 semanas após o início dos tratamentos. Genes de referência: GAPDH, PPIA, ATPase, RPL19 e β -actina. Resultados similares ocorreram com 4 semanas.....	41
FIGURA 23. Expressão relativa das enzimas hepáticas AKR1C e AKR1D em borregas 8 semanas após o início dos tratamentos . Genes de referência: GAPDH, PPIA, ATPase, RPL19 e β -actina. Resultados similares ocorreram com 4 semanas.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AKR1C = Aldo keto redutase 1C

AKR1D = Aldo keto redutase 1D

CYP2C = Citocromo P450 2C

CYP3A = Citocromo P450 3A

CL = corpo lúteo

E₂ = estradiol

FSH = hormônio folículo estimulante

GnRH = hormônio liberador de gonadotrofinas

HSD3B = 3B-hidroxiesteróide desidrogenase

IA = inseminação artificial

IMS = ingestão de matéria seca

INF-t = interferon-tau

LH = hormônio luteinizante

OPU = Ovum pick-up (aspiração follicular)

PC = peso corporal

PGF2 α = prostaglandina F2 α

P₄ = progesterona

RNAm = Acido Ribonucleico mensageiro

STAR = proteína de regulação aguda da esteroidogênese

UGT = uridina difosfato glucuronosiltransferase

MATTOS, F.C.S.Z. **Influência da ingestão alimentar nas concentrações plasmáticas de insulina e progesterona, e na expressão de enzimas hepáticas envolvidas no metabolismo de progesterona em ovelhas pré-púberes.** Botucatu, 2012. 54 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo deste experimento foi avaliar a influência da ingestão alimentar nas concentrações plasmáticas de insulina e progesterona (P4) e na expressão das enzimas hepáticas Citocromo P450 2C e 3A (CYP2C e CYP3A) e Aldo keto redutase (AKR1C e AKR1D) responsáveis pelo metabolismo de P4, em ovelhas pré-púberes. Borregas (n=24) F1 Dorper X Santa Inês, com idade média de 5 m e peso corporal (PC) médio de 29,4 kg foram confinadas em baias individuais. As ovelhas foram distribuídas em blocos de acordo com o PC inicial e divididas em dois grupos: Grupo Ad libitum (Ad), com ingestão média de 3,8% de matéria seca (MS) por kg de PC e Grupo Restrição (R), com 2,0% de MS por kg de PC. O estudo teve duração de 10 semanas, sendo 2 semanas de adaptação em manutenção e 8 semanas nas dietas experimentais. Ao final da quarta (S4) e da oitava semanas experimentais (S8), os animais receberam um dispositivo intravaginal de liberação de P4 (0,33 g de P4, CIDR, Pfizer), caracterizando o D0. Dinoprost (PGF_{2α}, 10 mg, i.m., Lutalyse, Pfizer) foi aplicado no D0 e D6. No D8, sangue foi colhido às -0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 h em relação ao fornecimento da dieta (0 h). Dosagens de insulina e P4 plasmáticas foram feitas por meio de radioimunoensaio. No D9, 4 h após a oferta da dieta, foi realizada biópsia hepática e o material foi preservado em RNA later (Invitrogen, EUA) para análise de expressão gênica (mRNA) por PCR quantitativo em tempo real. Os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do programa SAS e apresentados como média dos quadrados mínimos ± EP. O consumo diário alimentar foi de 1,8±0,04 e 0,6±0,01 kg/animal/d para o Grupo Ad e R, respectivamente (P<0,001). O grupo Ad teve um ganho médio semanal de 1,3±0,09 kg e o grupo R não teve alteração de PC (P<0001). As

concentrações de insulina foram maiores no Grupo Ad em relação ao Grupo R ($8,2\pm 0,94$ vs. $1,5\pm 0,16$ e $12,0\pm 1,03$ vs. $2,2\pm 0,19$ $\mu\text{UI/mL}$ ao final da S4 e S8, respectivamente; $P<0,0001$). Em geral, o pico pós-prandial de insulina ocorreu entre 3 e 5 h após início da ingestão alimentar. O Grupo Ad apresentou menor ($P<0,0001$) P4 plasmática do que o Grupo R tanto ao final da S4 ($3,2\pm 0,32$ vs. $5,5\pm 0,32$ ng/mL), quanto da S8 ($2,8\pm 0,29$ vs. $5,2\pm 0,29$ ng/mL). Em geral, as ovelhas tiveram concentrações mais baixas de P4 após 4 h do fornecimento do alimento. Não houve efeito de tratamento dietético após a ingestão alimentar ao final da quarta e oitava semana na expressão de RNAm de CYP2C, CYP3A, AKR1C e AKR1D. Portanto, diferentemente de estudos prévios, não foi detectado efeito inibitório da insulina circulante na expressão das enzimas CYP2C, CYP3A, AKR1C e AKR1D, assim como não houve evidência de que a insulina diminuiu o metabolismo de P4. Provavelmente, a dramática redução na P4 circulante após a alimentação ad libitum em relação às ovelhas com restrição alimentar, ocorreu devido ao elevado metabolismo de P4 em consequência de um maior fluxo sanguíneo hepático.

Palavras-chave: ingestão de matéria seca, hormônios esteróides, insulina, ovino.

Mattos, F.C.S.Z. **Influence of feed intake on plasma concentrations of insulin and progesterone, and expression of hepatic enzymes involved in metabolism of progesterone in prepubertal ewes.** Botucatu, 2012. 54 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The objective of this was to evaluate the influence of feed intake on plasma insulin and progesterone (P4) concentrations and the expression of the hepatic enzymes Cytochrome P450 2C and 3A (CYP2C e CYP3A), and Aldo keto reductase (AKR1C and AKR1D) responsible for metabolism of P4, in prepubertal sheep. Lambs (n=24) F1 Dorper x Santa Inês, 5 m old and with an average body weight (BW) of 29.4 kg were confined in individual stalls. The sheep were blocked according to the initial BW and divided into two groups: Ad libitum group (Ad), with average intake of 3.8% dry matter (DM) per kg of BW and Restriction group (R) with 2.0% DM per kg BW. The study lasted 10 weeks, with 2 weeks of a maintenance diet and 8 weeks on the experimental diets. At the end of the fourth (W4) and the eighth experimental weeks (W8), the ewes received an intravaginal P4 release device (0.33 g P4, CIDR, Pfizer), designated as D0. Dinoprost (PGF_{2α}, 10 mg, im, Lutalyse, Pfizer) was used on D0 and D6. On D8, blood was collected at -0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 h in relation to the time the diet was offered (0 h). Measurements of plasma insulin and P4 were done by radioimmunoassay. At D9, 4 h after diet introduction, a liver biopsy was performed and the sample stored in RNA later (Invitrogen, USA) for analysis of gene expression (mRNA) by quantitative real time PCR. Data were analyzed using PROC GLIMMIX of SAS and were presented as least squares means ± SE. The average daily feed intake was 1.8±0.04 and 0.6±0.01 kg/animal/d for the Ad and R Group, respectively ($P<0.001$). The Ad Group had an average weekly BW gain of 1.3±0.09 kg and the R group had no change in BW ($P<0.001$). Plasma insulin concentrations were higher ($P<0.0001$) in the Ad Group compared to the R Group at the end of W4 (8.2±0.94 vs. 1.5±0.16 μIU/mL) and W8 (12.0±1.03 vs. 2.2±0.19 μIU/mL). In general, the postprandial peak of insulin

occurred between 3 and 5 h after initiation of feed intake. The Ad Group had lower ($P<0.0001$) plasma P4 than Group R both at the end of W4 (3.2 ± 0.32 vs. 5.5 ± 0.32 ng/mL), and W8 (2.8 ± 0.29 vs. 5.2 ± 0.29 ng/mL). In general, ewes had the lowest P4 concentrations after 4 h of feeding. There was no effect of dietary treatment after eating food at the end of the fourth and eighth week in mRNA expression of CYP2C, CYP3A, and AKR1C AKR1D. Thus, in contrast to previous results, we did not find an inhibitory effect of elevated insulin on CYP2C, CYP3A, AKR1C and AKR1D, as there was no evidence that insulin led to decreased P4 metabolism. It seems likely that the dramatic decrease in circulating P4 after ad libitum feeding was due to elevated P4 metabolism due to a greater liver blood flow than found in ewes with feed restriction.

Keywords: Dry matter intake, steroid hormones, insulin, sheep.

1. Introdução

Dentre os fatores que exercem influência na reprodução, a nutrição tem um papel reconhecidamente importante por afetar diretamente aspectos da fisiologia e desempenho reprodutivo das fêmeas ruminantes. Diversos estudos discutem a influência da nutrição sobre a queda da fertilidade, principalmente em vacas leiteiras por causa da alta ingestão de matéria seca (IMS) (BUTLER, 2001; GONG et al., 2002a; WEBB et al., 2004). A redução da eficiência reprodutiva, em animais com alta IMS, pode ser devido às alterações na concentração dos hormônios circulantes. Uma das explicações para estas menores concentrações circulantes é que a elevada IMS promove maior metabolismo dos hormônios esteróides e, conseqüentemente, menores concentrações circulantes destes hormônios (PARR et al., 1993a; SANGSRITAVONG et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003).

Sangsrivong et al. (2002) ao comparar o metabolismo de hormônios esteróides em vacas lactantes e não-lactantes, em dietas de baixa e alta ingestão alimentar, observaram que animais com alta ingestão alimentar apresentaram maior fluxo sanguíneo hepático e, conseqüentemente, maior metabolização de progesterona (P_4) e estradiol (E_2). Baixas concentrações circulantes de P_4 , devido à elevada taxa de catabolismo, podem ser responsáveis pelo aumento das perdas de prenhez, observados principalmente em vacas leiteiras de alta produção, por causa da alta IMS que esses animais precisam ter para uma maior produção de leite.

Alguns trabalhos mostraram que tanto em vacas (SARTORI et al., 2004), quanto em ovelhas (PARR et al., 1982), a alta IMS reduz as concentrações circulantes de P_4 . Em 1982, Parr e colaboradores observaram que a dieta pode influenciar na metabolização da P_4 e não, necessariamente, na sua síntese. Tais autores mostraram que ovelhas alimentadas com dieta restrita e recebendo suplementação exógena de P_4 , apresentaram maiores concentrações circulantes de P_4 quando comparadas a ovelhas sob as mesmas condições, porém superalimentadas. Sartori et al. (2004) relataram que vacas lactantes apresentaram menores concentrações circulantes de P_4 do que novilhas e vacas secas. Este resultado, provavelmente, é decorrência da maior ingestão alimentar das vacas em lactação.

Grande parte da P_4 circulante é inativada ou catabolizada nos hepatócitos pelas enzimas citocromo P450 2C (CYP2C) e citocromo P450 3A (CYP3A; MURRAY, 1991,

1992). Embora vários estudos tenham relatado que a P_4 é catabolizada principalmente por essas enzimas, alguns autores tem observado outra via de catabolismo através das enzimas Aldo-keto reductase (AKR 1C e 1D), que são enzimas semelhantes à superfamília do Citocromo P450 e atuam na primeira fase da biotransformação de esteróides (PENNING et al., 2000; JINN et al., 2011).

Alguns trabalhos sugerem que a insulina inibe a expressão destas enzimas, reduzindo assim o catabolismo hepático de P_4 (LEMLEY et al., 2008a; MORIEL et al., 2008). Lemley et al. (2008a) sugeriram que a elevação nos níveis de insulina pode diminuir expressão e atividade destas enzimas hepáticas responsáveis pelo catabolismo de P_4 .

A insulina atua como um sinal do estado energético para o sistema nervoso central (SCHWARTZ et al., 2000). Portanto, dietas de alta energia que disponibilizam maiores quantidades de acetato e propionato no rúmen promovem maior secreção de insulina (BERGMAN et al., 1990). Smith et al. (2006) mostraram que o propionato é mais eficiente que o acetato, para aumentar as concentrações circulantes de insulina e também para reduzir a metabolização da P_4 .

Além disso, em um trabalho realizado recentemente por Lemley et al. (2010) foi observado que, vacas holandesas que receberam uma dieta rica em energia apresentaram uma diminuição na atividade das enzimas hepáticas CYP2C, CYP3A e AKR1C quando comparadas a dieta de alta fibra. Entretanto, as concentrações plasmáticas de insulina e expressão das enzimas hepáticas não tiveram diferença significativa entre as dietas experimentais. Isto sugere que o tipo de energia fornecida pode modular a taxa de inativação da P_4 no fígado. Portanto, fornecer uma dieta que estimula a secreção de insulina no período pós-parto pode melhorar concentrações periféricas de P_4 , principalmente nos primeiros dias após a inseminação, melhorando o desempenho reprodutivo dos animais (GONG et al., 2002).

Ainda há poucos estudos a respeito da regulação das enzimas que catabolizam a P_4 em bovinos e ovinos. Entretanto, como estes mecanismos fisiológicos são muito importantes, há a necessidade de maiores investigações, uma vez que a insulina e P_4 circulantes estão associadas à função reprodutiva.

REVISÃO DE LITERATURA

2. Influência da ingestão alimentar na reprodução de ruminantes

2.1 Hormônios e metabolismo

Os hormônios esteróides são compostos derivados do colesterol, apresentando um grupo de anéis fundidos e reduzidos (ciclopentano-fenantreno), e apresentando ou não cadeia carbônica lateral. Esses hormônios são produzidos pela glândula adrenal, gônadas e placenta. Os estrógenos, andrógenos, corticosteróides e a P₄ são hormônios esteróides. A P₄ além de ser uma molécula biologicamente ativa, também serve como precursor para a síntese de E₂. Estes hormônios possuem baixo peso molecular e são lipofílicos (HADLEY, 1992).

Estrógenos são hormônios esteróides produzidos pelos folículos, derivados do colesterol e possuem 18 átomos de carbono. A produção desse hormônio ocorre em resposta a estímulos das gonadotrofinas hipofisárias, sendo que, as células da teca interna sintetizam andrógenos por estímulo do hormônio luteinizante (LH), e estes irão se difundir para as células da granulosa, onde serão convertidos a estrógeno por estímulo do hormônio foliculo estimulante (FSH). Então o estrógeno é produzido pela conversão de andrógenos tecais pela enzima aromatase (SWENSON & REECE, 1993).

As principais funções do estrógeno são: promover o desenvolvimento dos órgãos e caracteres sexuais secundários da fêmea; potencializar os efeitos da ocitocina e prostaglandina F₂ alfa (PGF₂α) nas contrações uterinas; promover o crescimento e desenvolvimento dos ductos da glândula mamária; agir sobre o sistema nervoso central para induzir o estro na fêmea (receptividade sexual); estimulando assim juntamente com o FSH a produção de receptores para o LH nas células da granulosa, e também estimulando a secreção da onda pré-ovulatória de LH; e, provocando a ovulação do folículo dominante na ausência de P₄ ou a atresia na presença de P₄, tendo por consequência o desenvolvimento de nova onda folicular (SWENSON & REECE, 1993).

A P_4 é um hormônio esteróide fundamental para muitos processos reprodutivos. É secretada principalmente pelo corpo lúteo (CL), placenta e glândulas adrenais, assim como os estrógenos, é derivada do colesterol (HADLEY, 1992).

Existem apenas duas enzimas e uma proteína de transporte envolvidas na produção de P_4 a partir do colesterol. A primeira enzima citocromo P450, também conhecida como CYP11A1, está localizada na membrana mitocondrial interna e converte o colesterol em pregnenolona. A pregnenolona é então convertida em P_4 por outra enzima, a 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (HSD3B) que está localizada no retículo endoplasmático das células (WILTBANK et al., 2012 – no prelo).

A pregnenolona e a P_4 se difundem através das membranas (que são duas regiões hidrofílicas localizadas em cada lado da molécula), sendo assim, não precisam de proteínas de transporte. O colesterol não pode facilmente passar através das membranas, devido à natureza da bicamada lipídica e de sua própria natureza (somente uma região hidrofílica com o restante da molécula hidrofóbica). Portanto, o movimento de colesterol para a membrana mitocondrial interna é mediada pela proteína de transporte, chamada de proteína de regulação aguda da esteroidogênese (STAR). Assim, o caminho para a síntese de P_4 a partir do colesterol envolve o transporte de colesterol para a membrana mitocondrial interna pela STAR, a conversão do colesterol em pregnenolona pela CYP11A1 e, finalmente, a conversão de pregnenolona para P_4 por HSD3B (Figura 1; WILTBANK et al., 2012 – no prelo).

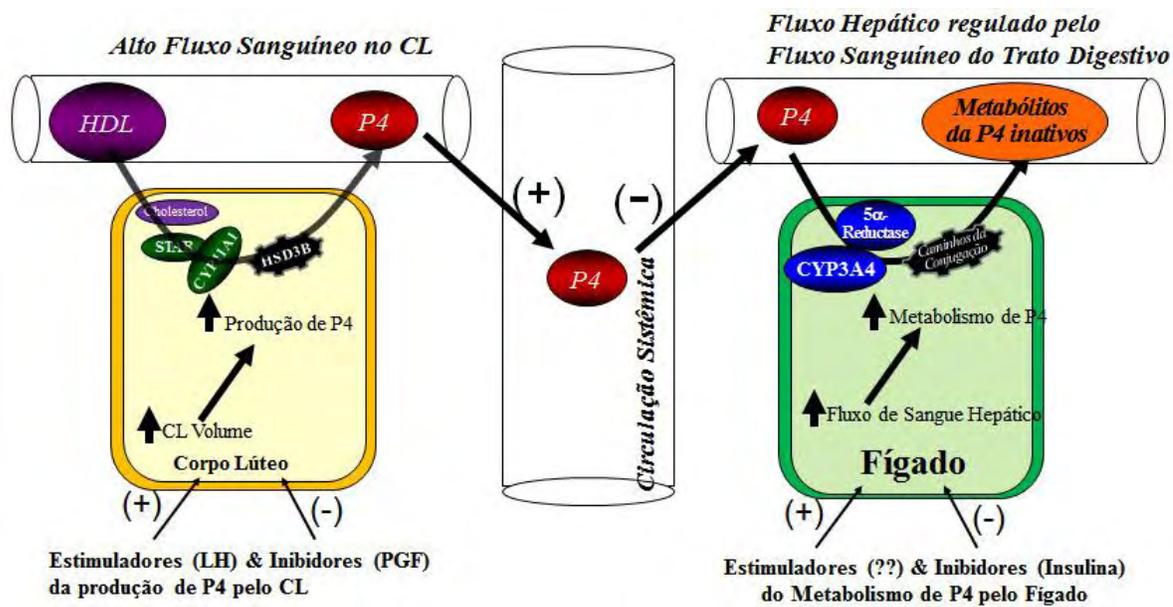


FIGURA 1. Ilustração esquemática da produção e metabolismo da progesterona. (Milo Wiltbank, 2012 – no prelo).

A síntese da P_4 no CL é realizada por pelo menos dois tipos celulares, que se diferenciam tanto morfológica como bioquimicamente, as pequenas e as grandes células. As pequenas originam-se das células da teca folicular e as grandes da granulosa. Mais de 80% da produção de P_4 pelo CL de ruminantes é devido às propriedades funcionais da célula luteal grande (NISWENDER et al., 2000).

A P_4 tem a função de preparar o endométrio para a implantação e manutenção da gestação através do aumento das glândulas secretoras do endométrio e também pela inibição de motilidade do miométrio; impede que o animal entre em cio, pois inibe o pico de LH necessário para ovulação, promovendo assim as condições necessárias para a gestação. Quando ocorre a regressão do CL, com conseqüente queda nas concentrações plasmáticas de P_4 em um animal gestante, ocorre aborto ou parto, devido ao útero perder essas condições necessárias à gestação. Além de manter a gestação, a P_4 estimula o desenvolvimento dos alvéolos das glândulas mamárias (HADLEY, 1992).

Baixas concentrações séricas de esteróides têm, potencialmente, numerosas conseqüências fisiológicas que podem comprometer a eficiência reprodutiva (SARTORI et al., 2004). Uma das explicações para menores concentrações de hormônios circulantes nos

animais com maior IMS estão, provavelmente, relacionadas a um maior metabolismo destes hormônios.

O aumento do metabolismo de esteróides devido ao alto consumo de alimento (MS) pode alterar a fisiologia da reprodução de quaisquer espécies, sendo mais pronunciado em animais que estão constantemente sob alta ingestão alimentar, como por exemplo, vacas leiteiras de alta produção (WILT BANK et al., 2006).

O aumento da IMS leva ao aumento do fluxo sanguíneo hepático (PARR et al., 1993b; SANGSRITAVONG et al., 2002) onde os hormônios esteróides são metabolizados. Consequentemente, com o aumento da IMS há uma redução nas concentrações circulantes desses hormônios, devido ao aumento da metabolização (Figura 2).

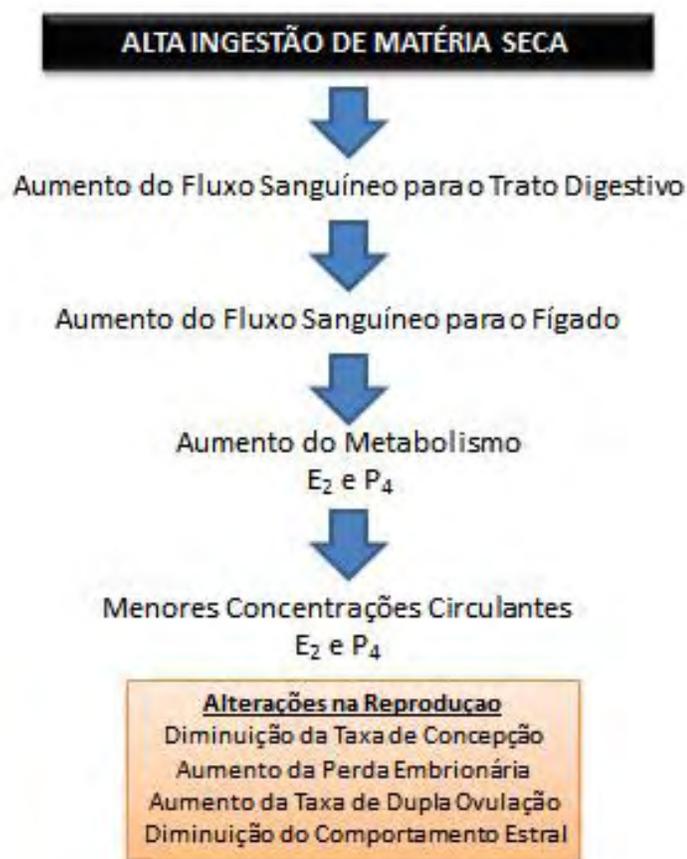


FIGURA 2. Esquema da principal via fisiológica que pode produzir mudanças na fisiologia reprodutiva observadas em vacas leiteiras de alta produção em lactação (Adaptado de Wiltbank, 2006).

Experimentos que compararam fêmeas bovinas em categorias zootécnicas distintas, incluindo diferentes níveis de ingestão alimentar, também descreveram alterações na função ovariana e na fisiologia reprodutiva desses animais, a se destacar menores concentrações circulantes dos hormônios esteróides (P_4 e E_2) em fêmeas com maior ingestão alimentar, apesar destas terem apresentado folículos e CLs maiores (SARTORI et al., 2004; WOLFENSON et al., 2004).

Em um trabalho realizado por Sartori et. al. (2004), onde novilhas e vacas em lactação foram monitoradas por ultrassonografia ovariana diária e dosagens hormonais, observou-se que as vacas em lactação ovularam folículos maiores e conseqüentemente apresentaram volume luteal maior, porém apresentaram menor concentração circulante de E_2 e P_4 (Tabela 1).

TABELA 1. Comparação entre novilhas e vacas leiteiras no tamanho folicular e concentração hormonal – P_4 e E_2 . Adaptado de Sartori et al. (2004).

	Novilhas	Vacas em lactação	P
Tamanho máximo do maior folículo ovulatório (mm)	14,9 ± 0,2 (n = 54)	16,8 ± 0,5 (n = 28)	0,0001
Pico de E_2 antes da ovulação (pg/mL)	11,3 ± 0,6 (n = 27)	7,9 ± 0,8 (n = 13)	0,0001
Máxima concentração sérica de P_4 (ng/mL)	7,3 ± 0,4 (n = 27)	5,6 ± 0,5 (n = 14)	0,0001
Volume do tecido luteal (mm ³)	7303 ± 308 (n = 27)	11120 ± 678 (n = 14)	0,0001

O maior metabolismo de E_2 nas vacas lactantes induz a formação de um folículo persistente, ou seja, o folículo precisa crescer mais para alcançar concentração suficiente de E_2 para induzir o pico pré-ovulatório de GnRH/LH e, conseqüente ovulação, o que pode explicar o fato de vacas lactantes apresentarem tamanho maior do folículo ovulatório (SARTORI et al., 2004).

Em um trabalho realizado por Martins et al. (2008), onde 18 vacas aneloradas foram divididas em dois grupos, alta ingestão alimentar (170%) e baixa ingestão alimentar (66%), os animais com alta ingestão apresentaram menores concentrações séricas de E₂, provavelmente devido ao maior metabolismo desse hormônio. Por outro lado, os animais do grupo com baixa ingestão, apresentaram pico pré-ovulatório de E₂ de $17,2 \pm 2,5$ pg/mL e o grupo com alta ingestão apresentou $9,8 \pm 1,2$ pg/mL.

2.2 Efeitos na Reprodução

2.2.1. *Duração do estro*

Alterações na ingestão de energia também influenciam a reprodução através de mudanças na duração e intensidade do estro.

Um estudo avaliou a duração do estro em um grupo de vacas em lactação utilizando o sistema Heat Watch. Este sistema permitiu o monitoramento dos animais 24 horas por dia e pode ser usado para calcular a duração do estro em vacas leiteiras. Vacas com produção de leite acima da média do rebanho (40 kg /dia) tiveram menor ($P < 0,001$) duração do estro ($6,2 \pm 0,5$ h) do que vacas com menor produção de leite ($10,9 \pm 0,7$ h; Figura 3; LOPEZ et al., 2004).



FIGURA 3. Relação entre produção de leite e duração do estro. A análise incluiu todas as ovulações simples (n = 350), exceto a primeira ovulação pós-parto. Produção média de leite: 10 dias antes do estro (LOPEZ et al., 2004).

Alta produção de leite associada à alta ingestão alimentar, leva à diminuição nas concentrações circulantes de E_2 , resultando em menor duração e intensidade do estro (WILTBANK et al., 2006). Este efeito da IMS nas características do estro não é exclusivo de fêmeas de raças leiteiras. Em um trabalho com novilhas Nelore nulíparas, onde a única diferença entre os grupos experimentais foi a quantidade de energia fornecida, os animais submetidos à restrição alimentar (0,7M) apresentaram duração do estro mais prolongada (17 vs. 11 h) e comportamento de cio mais intenso, caracterizado por três vezes mais aceites de monta quando comparadas às novilhas superalimentadas (1,7M; MOLLO et al., 2007).

2.2.2. Estruturas ovarianas (CL e folículo)

Estudos mostraram influência dessas alterações induzidas pela nutrição no número de folículos recrutados (GONG et al., 2002b), na taxa de crescimento folicular (MURPHY et al., 1991; BOSSIS et al., 1999; ARMSTRONG et al., 2001), no tamanho do folículo

ovulatório (MURPHY et al., 1991; BOSSIS et al., 1999) e do CL (MURPHY et al., 1991). Entretanto, a maioria destes estudos foi realizada com animais da raça européia.

No trabalho realizado por Lopez et al. (2004), onde se avaliou a duração do estro de vacas em lactação, foi verificado que as vacas com maior produção leiteira (46,8 kg/dia) apresentaram folículos maiores ($18,6 \pm 0,3$ versus $17,4 \pm 0,2$ mm de diâmetro; $P < 0,01$), mas com concentrações circulantes de E_2 inferiores ($6,8 \pm 0,5$ vs. $8,6 \pm 0,5$ pg/mL, $P < 0,01$), em relação à vacas com menor produção leiteira ($32,3 \pm 0,6$ kg/d).

Dois estudos realizados no Brasil com fêmeas da raça Nelore sob baixa (0,7M) ou alta (1,7M) IMS avaliaram características do ciclo estral, tanto em novilhas (MOLLO et al., 2007) quanto em vacas não lactantes (MARTINS et al., 2008). No primeiro trabalho, as novilhas submetidas à alta IMS ovularam folículos maiores e formaram CLs maiores sem, entretanto, apresentarem diferenças nas concentrações circulantes de E_2 e P_4 . No segundo estudo, apesar de não ter sido detectada diferença no tamanho do folículo ovulatório entre vacas com alta e baixa IMS, as concentrações séricas pré-ovulatórias de E_2 foram maiores nas vacas com baixa IMS.

2.2.3 Fertilidade

O metabolismo aumentado da P_4 , também pode estar relacionado com a queda na fertilidade em fêmeas superalimentadas. Reduzidas concentrações séricas de P_4 antes da inseminação artificial (IA), foram associadas à queda de fertilidade em vacas (FONSECA et al., 1983).

Um estudo conduzido por Sartori et al. (2002), durante o inverno, onde avaliou a produção de embriões em vacas secas e em lactação, com produção média de $45,9 \pm 1,4$ kg/d, foi observado menor percentual de embriões viáveis em vacas lactantes (52,8%), comparado com vacas secas (82,3%), isto pode ser justificado pelo maior metabolismo de hormônios esteróides nas vacas lactantes.

Da mesma forma, vacas doadoras de ovócitos com concentrações circulantes muito baixas de P_4 tiveram uma menor taxa de clivagem e menor produção *in vitro* de embriões do que aquelas com concentrações sanguíneas mais elevadas de P_4 (PFEIFER et al., 2009). Baixas concentrações séricas de P_4 levam a um aumento na frequência de pulsos de LH

(ROBERSON et al., 1989; ADAMS et al., 1992), podendo causar maturação prematura dos ovócitos (REVAH & BUTLER, 1996), queda na qualidade ovocitária no momento da ovulação e, conseqüentemente, da qualidade embrionária após a fecundação (AHMAD et al., 1995). Entretanto, é importante ressaltar que no caso de produção *in vitro* de embriões, a OPU (ovum pickup) é realizada em folículos, na sua maioria, abaixo do tamanho do desvio folicular e, portanto, não possuem receptores de LH nas células da granulosa (XU et al., 1995; BODENSTEINER et al., 1996). Desta forma, os mecanismos envolvidos com a baixa eficiência de produção de blastocistos em doadoras de ovócitos sob concentrações circulantes de P₄ muito baixas, podem ser distintos daqueles que ocorrem em folículos pré-ovulatórios.

Estudos em vacas e ovelhas mostraram que suplementação de P₄ durante os primeiros 4 a 6 dias após a IA aumentou o crescimento embrionário ou fetal (GARRETT et al., 1988; KLEEMANN et al., 1994). Outros estudos em bovinos obtiveram resultados semelhantes, pois com a elevação das concentrações circulantes de P₄ através do uso de dispositivos intravaginais de P₄, no Dia 3 do ciclo estral (CARTER et al., 2008) ou por meio de superovulação da doadora/receptora (LONERGAN et al., 2007), os autores obtiveram um aumento no crescimento embrionário.

3. INSULINA

A insulina é secretada pelas células β do pâncreas e tem papel central no metabolismo corporal. Além de sua ação anabólica, também atua como sinal do estado energético para o sistema nervoso central. Estudos com cultivo *in vitro* de células hipotalâmicas tem mostrado que a insulina pode estimular a liberação de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), sendo também necessária para a pulsatilidade normal de LH (ARIAS et al., 1992; BUTLER et al., 2003).

No ovário, receptores de insulina estão amplamente distribuídos nas células da granulosa, da teca e estroma ovariano (PORETSKY & KALIN 1987). Concentrações fisiológicas de insulina, provavelmente são necessárias para a esteroidogênese folicular, sob ação do FSH, além de atuar como um potente estimulador da mitose (BOSSIS et al., 1999; BUTLER et al., 2003). Além disso, sugere-se que a insulina também tenha efeito na

metabolização dos esteróides, uma vez que aparentemente reduz a expressão das enzimas responsáveis pela metabolização dos mesmos (LEMLEY et al., 2008b), entretanto, estas informações precisam ser confirmadas.

Em um estudo realizado por Moriel et al. (2008) com vacas ovariectomizadas e não lactantes, com dispositivo intravaginal de P_4 , observou-se que as vacas com maior concentração circulante de insulina também apresentavam maiores concentrações circulantes de P_4 quando comparadas a vacas com menor insulina circulante na primeira hora após ingestão alimentar. Entretanto, a partir do momento em que o fluxo sanguíneo hepático atingiu o aumento máximo, o qual espera-se ocorrer em torno de 3 h após a ingestão, a insulina não foi mais capaz de conter a metabolização da P_4 .

Acredita-se que a insulina pode modular a concentração sérica de P_4 pelo efeito inibitório no catabolismo hepático deste hormônio. Porém, ainda não está claro se esse efeito da insulina é dose-dependente, uma vez que estes animais não apresentavam concentrações circulantes de insulina muito acima dos níveis fisiológicos.

Além disso, Smith et al. (2006) mostraram que o propionato é mais eficiente que o acetato, para aumentar as concentrações circulantes de insulina e também para reduzir a metabolização da P_4 . Dessa forma, pode-se sugerir que a composição da dieta fornecida pode atenuar a metabolização da P_4 e manter suas concentrações circulantes mais elevadas, uma vez que dietas ricas em carboidratos não fibrosos são mais eficientes em disponibilizar propionato aos ruminantes. Lemley et al. (2009), relataram uma diminuição na atividade de CYP2C e CYP3A depois de desafiar hepatócitos com aumento das concentrações fisiológicas de insulina.

4. ENZIMAS HEPÁTICAS

A maioria da P_4 circulante é inativada ou catabolizada nos hepatócitos pelas enzimas CYP2C e CYP3A, e os principais metabólitos são a 21-hidroxiprogesterona e a 6 β -hidroxiprogesterona, respectivamente (MURRAY, 1991, 1992). Embora vários estudos tenham relatado que a P_4 é catabolizada principalmente pelas enzimas CYP3A e CYP2C, diversos autores tem observado outra via de catabolismo através das enzimas AKR, enzimas semelhantes à superfamília do Citocromo P450. As AKRs são enzimas que atuam

na primeira fase da biotransformação de esteróides, especificamente nas posições 3α , 17β e 20α (PENNING et al., 2000; LEMLEY et al., 2010; JIN et al., 2011; Figura 4). Portanto, no fígado a P_4 sofre hidroxilação pelas enzimas P450, principalmente CYP3A4 e CYP2C19, ou redução pela via 5α redutase, principalmente as Aldo keto redutase, especificamente a AKR1C e AKR1D.

Na segunda fase, as enzimas uridina difosfato glucuronosiltransferase (UGT, mais especificamente 1A e 1B) conjugam o metabólito hidroxiprogesterona com o ácido glicurônico (Figura 4; BOWALGAHA et. al., 2007).

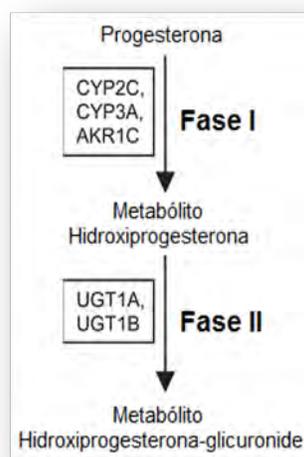


FIGURA 4. Esquema geral da inativação da progesterona nos hepatócitos. Durante a primeira fase as enzimas envolvidas são Citocromo P450 2C (CYP2C), P450 3A (CYP3A) e Aldo Keto Redutase (AKR1C), e na segunda fase as enzimas uridina difosfato glucuronosiltransferase (UGT1A e UGT1B). Na primeira fase o metabólito conjugado é hidroxiprogesterona e após a segunda fase as UGTs conjugam o metabólito hidroxiprogesterona com o ácido glicurônico. Fonte: Lemley e Wilson (2010).

Quando a P_4 sofre hidroxilação pela AKR1C1, é convertida em 20α -hidroxiprogesterona que é então reduzida pela AKR1D1 em 20α -hidroxi- 5β -pregnane-3-one e pode ainda ser reduzida pelas AKR1C4,1,2,3 em 5β -pregnane- 3α , 20α -diol. Seguindo outro caminho, a P_4 pode ser diretamente hidroxilada pela AKR1D1. Desta forma, os

compostos resultantes são 5 β -pregnane-3,20-dione e 3 α -hidroxi-5 β -pregnane-20-one, consecutivamente (Figura 5; JINN et al., 2011).

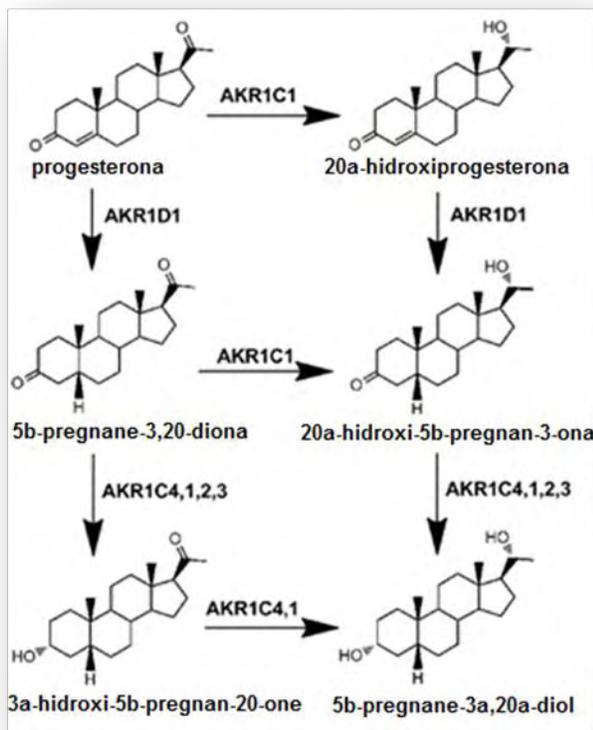


FIGURA 5. Esquema: Função das AKRs no metabolismo de progesterona. Fonte: Jinn et al. (2011).

As enzimas Citocromo P450 estão presentes na maioria dos tecidos, porém a maior parte está altamente expressa em hepatócitos (representam de 1 a 2% da massa dos hepatócitos), e estão localizadas no retículo endoplasmático liso (RUCKPAUL & REIN, 1984). Os citocromos P450 estão envolvidos no metabolismo de inúmeros compostos endógenos, incluindo a atividade 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).

É importante ressaltar que embora o envolvimento das CYPs no metabolismo hepático em ruminantes esteja bem elucidado e tem sido descrito em muitos estudos, o mecanismo pelo qual as AKRs estão envolvidas no metabolismo de esteróide não está totalmente elucidado. As AKRs estão envolvidas na redução da glicose, metabolismo das

prostaglandinas, geração de ácidos biliares, e redução dos esteróides contendo grupos aldeído ou cetona (PENNING et al., 2000). As AKRs, especificamente a AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 e AKR1C4 são encontradas em diferentes tecidos. No entanto, as AKR1C4 são enzimas exclusivas do fígado, com maior capacidade de metabolização, além disso, têm como produto de metabolismo apenas hormônios esteróides (JINN et al., 2011).

Alguns trabalhos mostraram que a presença da insulina altera a expressão destas enzimas. Lemley et al. (2008a) mostraram que a insulina altera a expressão destas enzimas em vacas leiteiras. Tais autores, primeiramente induziram o aumento da insulina, por meio de infusão de propilenoglicol e detectaram menor expressão da CYP3A. Posteriormente, infundiram insulina e glicose, a fim de causar uma curva hiperinsulinêmica-euglicêmica e observaram que a insulina causou um decréscimo dose-dependente na expressão de ambas enzimas CYP2C e CYP3A.

Em outro trabalho realizado por Lemley et al. (2008b), porém com ovelhas ovariectomizadas e suplementadas com propionato vs. acetato, foi observada uma diminuição de aproximadamente 50% na atividade de ambas enzimas (CYP3A e CYP2C) 1 h após a alimentação no grupo que recebeu propionato. Estes resultados em ovinos foram a primeira evidência ligando concentrações elevadas de insulina com atividade reduzida das enzimas responsáveis pela biotransformação de P₄ *in vivo*.

Entretanto, Vieira (2012) observou que vacas mestiças, ovariectomizadas e não lactantes, recebendo infusão intravenosa de glicose em diferentes balanços energéticos (BE), demonstraram um aumento nas concentrações circulantes de insulina e também um aumento na expressão de CYP3A em vacas em balanço energético negativo (BEN) quando comparada a vacas em balanço energético positivo (BEP).

Portanto, tendo em vista essas informações contrastantes e havendo poucos estudos sobre a importância fisiológica das enzimas CYP2C, CYP3A, AKR1C e AKR1D “*in vivo*” no catabolismo de P₄, esse estudo foi delineado com o objetivo de avaliar a influência da quantidade de dieta fornecida nas concentrações dos hormônios esteróides, bem como dos hormônios metabólicos, de forma que se pudesse avaliar o cenário nutricional influenciando na expressão das enzimas hepáticas.

5. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as concentrações circulantes de insulina e P_4 e a expressão de enzimas hepáticas envolvidas no metabolismo da P_4 em ovelhas pré-púberes submetidas à dieta *ad libitum* ou dieta restrita.

6. HIPÓTESES

Ovelhas superalimentadas apresentam maiores concentrações circulantes de insulina por até 4 h após a ingestão alimentar comparadas às ovelhas em restrição alimentar. Este aumento é suficiente para reduzir a expressão das enzimas hepáticas, responsáveis pela metabolização da P_4 . Conseqüentemente, ovelhas com maiores concentrações circulantes de insulina, apresentam menor metabolismo de P_4 .

7. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos e protocolos envolvendo a utilização de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisas (CEUAP/ESALQ-USP; protocolo n°: 2010-4) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNESP; protocolo n°: 104/2010).

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal em parceria com o Sistema Intensivo de Produção de Ovinos e Caprinos (SIPOC) do Departamento de Zootecnia (LZT) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Piracicaba, SP, Brasil.

7.1 Animais e Dietas

Foram utilizadas 24 borregas pré-púberes, F1 Dorper x Santa Inês, com idade média de 5 meses, confinadas em 24 baias de alvenaria individuais (Figura 6).



FIGURA 6. Baias de alvenaria individuais onde as borregas foram manejadas na ESALQ, USP, Piracicaba, SP.

Após 15 d da fase de adaptação, os animais foram divididos em cinco blocos de acordo com o peso corporal (PC) inicial, que variava de 18 a 29kg, e dentro dos blocos, aleatoriamente designados aos dois grupos experimentais baseados no fornecimento de alimento: dieta *ad libitum* e dieta restrita. A dieta restrita foi formulada para que as borregas, apesar de estarem em fase de crescimento, mantivessem o mesmo PC durante todo o período de estudo.

Os grupos permaneceram recebendo as dietas por um período de 8 semanas. Os animais receberam fornecimento da mesma dieta, baseada em recomendações do NRC (2000), constituída de 90% de concentrado e 10% de volumoso (Tabela 2), com alteração apenas na quantidade fornecida. Metade das borregas recebeu alimentação com ingestão diária de 2% de matéria seca por kg de PC (dieta restrita) e a outra metade recebeu fornecimento de dieta à vontade, com expectativa de ingestão diária de 3,8% de matéria seca por kg de PC (dieta *ad libitum*). Além disso, todos os animais tiveram acesso livre à água. Diariamente, o consumo de matéria seca foi estimado através da pesagem da quantidade oferecida, menos as sobras dos cochos.

TABELA 2. Ingredientes e composição da dieta oferecida aos ovinos.

INGREDIENTES	COMPOSIÇÃO (%MS)
<i>Feno de Coast cross</i>	10,0
Milho moído	70,4
Farelo de soja	16,0
Cloreto de amônio	0,5
Calcário	1,5
Mistura Mineral*	1,6
COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA	
Matéria Seca	90,4
Proteína Bruta	18,0
Extrato Etéreo	4,0

* **Composição:** 7,5% P, 13,4% Ca; 1% Mg; 7% S; 14,5% Na; 21,8% Cl; 500 ppm Fe; 300 ppm Cu; 4600 ppm Zn; 1100 ppm Mn; 55 ppm I; 40 ppm Co; 30 ppm Se.

7.2 Colheita de Amostras

Na última semana de adaptação foram realizadas colheitas de sangue nos intervalos: -0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 h em relação ao momento da oferta da dieta (0 hora), a fim de determinar a curva de insulina plasmática e por quanto tempo as concentrações circulantes permaneceram elevadas após a ingestão.

Após 4 e 8 semanas do início do fornecimento das dietas, no D0 foi realizada colheita de sangue de todos os animais para dosagem de P₄, a fim de confirmar que todas as fêmeas seriam pré-púberes. Assim não haveria liberação endógena de P₄ diferenciada entre os animais, ou seja, descartaria a possibilidade de presença de CL em algumas fêmeas no momento da avaliação das concentrações circulantes de P₄ provenientes de um dispositivo intravaginal.

Neste mesmo momento (D0), após a colheita de sangue e aplicação de PGF2 α (i.m., Lutalyse; Pfizer) os animais receberam um dispositivo intravaginal de liberação de P₄ (CIDR; 0,33g P₄; Pfizer), permanecendo com o dispositivo por 9 dias (Figura 7). No D6 foi

realizada outra aplicação de $\text{PGF2}\alpha$, e no D8 foram realizadas colheitas de sangue nos seguintes intervalos: -0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 h em relação ao momento da oferta da dieta (0 hora), a fim de determinar as curvas de insulina e P_4 plasmáticas (Figura 8). As amostras de sangue foram colhidas por venopunção da veia jugular, em tubos de vacutainer com anticoagulante (heparina sódica), e centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos. O plasma foi armazenado em criotubos Eppendorf, devidamente identificados a -20°C , para posteriores dosagens hormonais pela técnica de radioimunoensaio (RIA).

Por razões de perda do implante intravaginal de P_4 (CIDR) de alguns animais, os resultados de dosagens hormonais não são necessariamente referentes aos 24 animais.

No D₉ foi realizada a biopsia hepática desses animais para posterior análise da expressão gênica das enzimas hepáticas pela técnica de PCR em tempo real, e retirada do dispositivo intravaginal de P_4 .



FIGURA 7. Esquema ilustrativo das colheitas de sangue, colocação do dispositivo intravaginal de P_4 e aplicação de prostaglandina ($\text{PGF2}\alpha$).

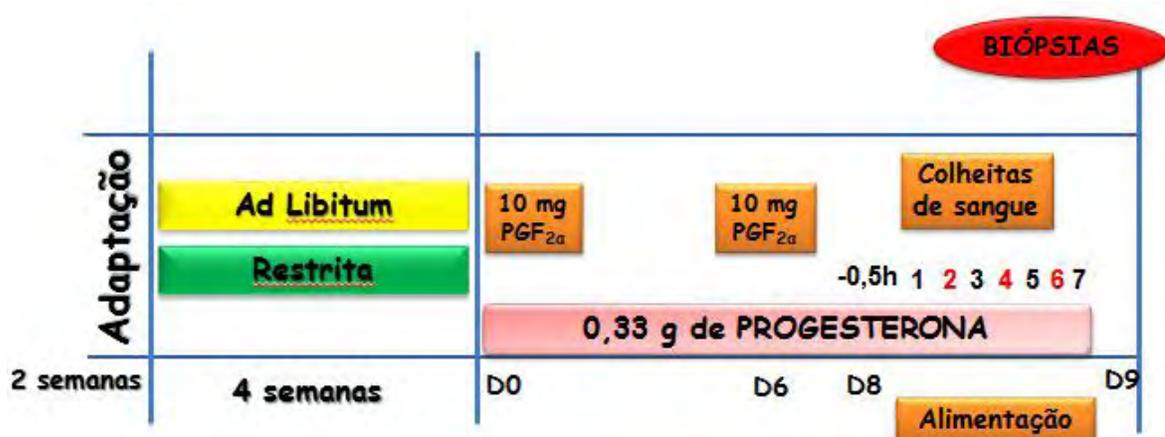


FIGURA 8. Esquema geral do período experimental. Durante o período de adaptação (15 d), os animais receberam fornecimento da mesma dieta, com ingestão diária de 3% de matéria seca por kg de PC. Após o período de adaptação, os animais foram aleatoriamente designados aos dois grupos experimentais baseados no fornecimento de alimento: dieta *ad libitum* (alimentação com ingestão diária de 3,8% de matéria seca por kg de PC) e dieta restrita (alimentação com ingestão diária de 2% de matéria seca por kg de PC). Após 4 e 8 semanas do início do fornecimento das dietas, no D0 foi realizada colheita de sangue de todos os animais. Neste mesmo momento (D0), após a colheita de sangue e aplicação de PGF_{2α} os animais receberam um dispositivo intravaginal de liberação de P₄ (CIDR; 0,33g), permanecendo com o dispositivo por 9 d. No D6 foi realizada outra aplicação de PGF_{2α}, e no D8 foram realizadas colheitas de sangue nos seguintes intervalos: -0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 h em relação ao momento da oferta da dieta (0 hora).

7.3 Biopsias Hepáticas

As biopsias hepáticas foram realizadas no D9, aproximadamente 4 h após o fornecimento da dieta seguindo o método de Lemley et al. (2010). Para a cirurgia foi realizada a tricotomia do flanco direito, seguida de assepsia com solução de iodo degermante. Estando o campo cirúrgico limpo e asséptico, foi realizada anestesia local com lidocaína, do tipo infiltrativa subcutânea, no 11^o espaço intercostal, a aproximadamente 12

cm ventral à coluna vertebral. Foi feita uma incisão de aproximadamente 1 cm na pele com o bisturi, e para coletar as amostras de fígado foi utilizada a agulha de biópsia 14 GA X 15 cm (TRU-CUT; Biocompany, Brasil; Figura 9). Após o procedimento cirúrgico o local da incisão foi tratado com Unguento Pearson (Eurofarma, Brasil) e com mata bicheira (Bactrovet Prata, König, Alemanha) e os animais foram tratados com penicilina (Pencivet® Plus, Shering, Brasil). As amostras de fígado foram preservadas em RNAlater® (Ambion,USA) dentro de criotubos Eppendorf, devidamente identificados e armazenados em freezer a -20°C até as análises laboratoriais.

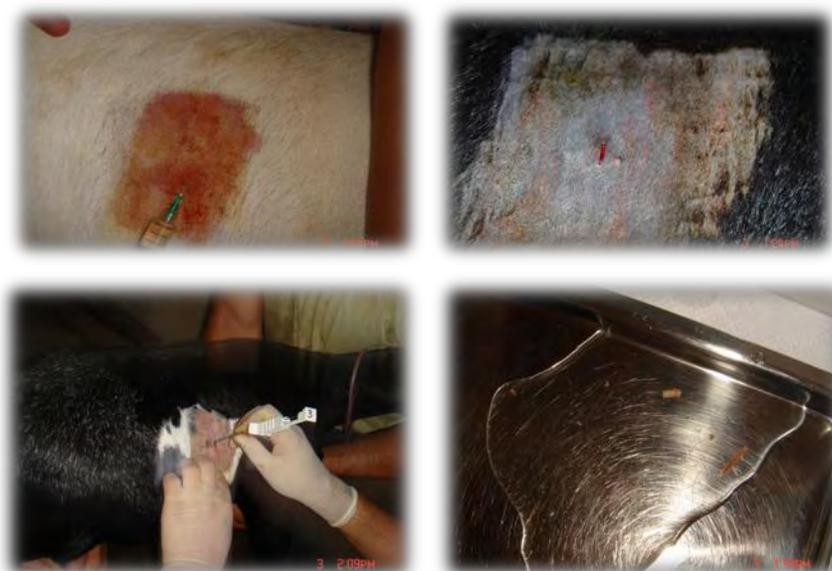


FIGURA 9. Esquema ilustrativo da anestesia local com lidocaína, incisão de aproximadamente 1 cm na pele com o bisturi, coleta das amostras de fígado utilizando a agulha de biópsia TRU-CUT, e amostra de fígado.

7.4 Avaliação da expressão do RNAm

As análises de expressão gênica foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP.

As amostras de fígado foram homogeneizadas (Ika T10 basic Ultra Turrax®; Figura 10) e submetidas à extração total do RNA do tecido com o uso de reagente Trizol® (Invitrogen, Brasil), de acordo com o descrito no protocolo do fabricante, o qual corresponde a uma adaptação da metodologia descrita por Chomczynski e Sacchi (1987).



FIGURA 10. Extração total do RNA do tecido hepático.

Após a extração, a quantificação individual do RNA extraído de cada uma das amostras foi realizada pelo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA; Figura 11). As amostras de RNA total foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% para comprovação de sua integridade (Figura 12).



FIGURA 11. Após a extração, a quantificação individual do RNA extraído de cada uma das amostras foi realizada pelo Nanodrop 2000.

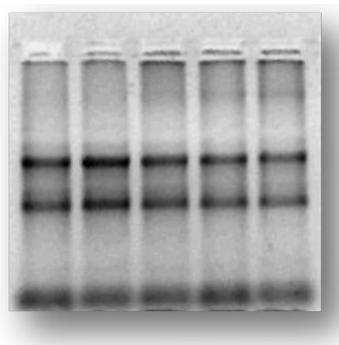


FIGURA 12. Amostras individuais de RNA total extraídas do tecido hepático das borregas, em gel de agarose (1%).

A síntese de cDNA foi realizada segundo protocolo do *Kit SuperScript® III Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Os cDNAs foram sintetizados à partir de 1µg de RNA total das amostras de tecido.

Os pares de primers específicos para cada um dos genes estudados foram selecionados baseado na sequência dos mesmos depositadas no GenBank para a espécie ovina (Tabela 3) e adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda e Life Technologies Brasil (São Paulo, SP). Importantes considerações para a realização da técnica de RT-qPCR, descritas por Udvardi et al. (2008) e por Bustin et al. (2009), também foram adotadas. Todos os primers foram otimizados para amplificarem a 58°C. Para o controle interno foram utilizados cinco genes de referência: β -actina; ciclofilina A (*PPIA*); proteína ribossomal L19 (*RPL19*); gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*); e, *ATPase*, sendo estes selecionados de acordo com a estabilidade através do software *geNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002) para serem utilizados nas análises estatísticas como genes de referência. A especificidade dos produtos de RT-qPCR também foi confirmada através da eletroforese de gel de agarose. Além disso, foi realizada a análise da curva de melting para a verificação da temperatura de desnaturação do produto amplificado, conforme descrito por Zaros et al. (2007).

TABELA 3. Sequência dos primers utilizados e tamanho dos fragmentos amplificados para avaliação dos genes alvo (*CYP2C19*, *CYP3A4*) e constitutivos (β -actina, *PPIA*, *GAPDH*, *ATPase*, *RPL19*).

Gene	Sequência (5'-3')		Tamanho do fragmento (PB)	Gen Bank Nº de acesso
CYP2C19	D	CAAGAATCCCTGGACCTCAA	193	NM_001205152.1
	R	GCTTCAGCAGGAGCAGGAG		
CYP3A4	D	GGCTCTGTAAGAAGGATGTGG	189	NM_001129904.1
	R	CCAGTTCCAAAAGGCCAGGTA		
AKR1C4	D	ACCAGCCTTGGAAAAGTCAC	-	-
	R	TGGGTCCTTACACTTCTCCA		
AKR1D1	D	AGGACACTCAAGGACCTCCA	-	-
	R	ACTTCACCAAGCCAGCATCT		
β -actina	D	ACTGGGACGACATGGAGAAG	167	NM_001009784.1
	R	GTACATGGCAGGGGTGTG		
PPIA	D	TCTGAGCACTGGAGAGAAAGG	178	AY 251270.1
	R	GATGCCAGGACCTGTATGCT		
GAPDH	D	GGCGTGAACCCACGAGAAGTATAA	394	NM_001190390.1
	R	CCCTCCACGATGCCAAAAGT		
ATPase	D	TTCCTACTGCCCTGGAATG	98	NM_001009396.1
	R	CACGAAAGATGAGAAGCGAGT		
RPL19	D	GAAATCGCCAATGCCAAC	361	AY158223.1
	R	GAGCCTTGCTGCGCTTCA		

As análises de PCR em tempo real foram realizadas através do sistema de detecção *Lightcycler*[®] 480 (Roche) utilizando o kit *Lightcycler*[®] 480 SYBR Green I Master (Roche). As condições das reações foram: 0,4µM de cada primer, 5µL do SYBR Green Mix 2X e 1µL de cDNA diluído oito vezes à partir do estoque; o volume final foi ajustado para 10µL. Os ciclos da PCR foram feitos da seguinte maneira: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação que compreenderam etapa inicial a 95°C (5 segundos), anelamento por 30 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos. A seguir foi a curva de melting dos produtos: a partir de 65°C, as amostras foram gradativamente aquecidas até 95°C, com aquisição contínua do sinal de fluorescência pelo equipamento.

A eficiência individual de cada amostra foi calculada utilizando-se o programa *LingRegPCR* (RAMAKERS et al., 2003), utilizando no mínimo quatro pontos da curva de amplificação durante a fase exponencial. Os dados de fluorescência obtidos no equipamento PCR em tempo real foram exportados para o programa *LingRegPCR*, o qual utiliza uma análise de regressão linear dos dados de fluorescência da fase exponencial da PCR para determinar a quantidade de RNAm e a eficiência de amplificação. Através do *LingRegPCR* os valores de Ct foram determinados para cada amostra.

A partir da eficiência individual das amostras obtidas pelo software, foi adotado um procedimento de correção dos valores de Ct para a eficiência ideal de amplificação (2.0).

7.5 Dosagens Hormonais

Insulina. As dosagens hormonais para concentração de insulina foram realizadas por meio da técnica de radioimunoensaio (RIA) seguindo o protocolo do kit Coat-A-Count – Insulina (Siemens[®], Los Angeles CA, USA) em que a sensibilidade foi de 1,2 µUI/mL e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 8,5% e inter-ensaio foi de 9,9%. Realizada no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento da FMVZ, UNESP/Botucatu-SP.

Progesterona. As dosagens hormonais para concentração de P₄ foram realizadas por meio da técnica de radioimunoensaio (RIA) seguindo o protocolo do kit Coat-A-Count – Progesterona (Siemens[®], Los Angeles CA, USA) em que a sensibilidade foi de 0,02 ng/mL e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 2,9% e inter-ensaio foi de 7,4%.

Realizada no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento da FMVZ, UNESP/Botucatu-SP.

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foram removidos os *outliers*, com o auxílio da análise via gráfico *box-plot*. Os dados foram analisados utilizando a metodologia dos modelos lineares generalizados, com auxílio do procedimento PROC GLIMMIX do programa SAS.

O modelo estatístico usado para consumo alimentar continha os efeitos fixos: blocos, tratamento nutricional (dieta *ad libitum* e dieta restrita), semanas das avaliações, interação entre dieta e semana das avaliações, e como aleatório o erro experimental.

Para o ganho de peso médio no período o modelo incluiu os efeitos de bloco e tratamento nutricional (dieta *ad libitum* e dieta restrita), e como aleatório o erro experimental.

As medidas repetidas de concentrações de insulina durante o período de adaptação continham os efeitos de bloco, efeito de semanas das avaliações, e os efeitos aleatórios de animal e erro experimental, considerando-se a melhor matriz de correlação entre as medidas no mesmo animal.

Para as concentrações de insulina e progesterona na quarta e na oitava semanas, analisadas independentemente, o modelo inclui os efeitos de bloco, tratamento nutricional (dieta *ad libitum* e dieta restrita), efeito de hora das avaliações, interação entre dieta e hora, e os efeitos aleatórios de animal e erro experimental, considerando-se a melhor matriz de correlação entre as medidas do animal.

Para a quantificação relativa, os valores de Ct foram determinados para cada amostra pelo programa *LingRegPCR*. Para a normalização dos dados, os valores de Ct dos genes referência foram analisados considerando-se um modelo estatístico que incluiu o efeito fixo dos genes de referência (*β -actina*, *PPIA*, *GAPDH*, *ATPase*, *RPL19*), e um efeito aleatório associado ao animal, como forma de considerar a variabilidade natural do indivíduo amostrado, com abordagem de modelos mistos, usando a equação a seguir:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + a_j + e_{ij}$$

Em que:

Y_{ij} é o Ct na base 2 observado para o gene referência i no animal j;

μ é a média geral;

g_i é o efeito fixo do i^{th} gene referência ($i= 1, \dots, 7$);

a_j é o efeito aleatório associado ao animal considerando $a_j \sim \text{NID}(0, \sigma_a^2)$;

e_{ij} é o efeito aleatório residual, com $e_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma_e^2)$.

A partir deste modelo foram obtidos os valores BLUP (Best linear unbiased predictor) para o efeito animal, sendo estes considerados como fatores de ajustes dos valores de Ct dos genes alvos (CYP2C e CYP3A).

Os efeitos dos tratamentos encontrados para as diferentes enzimas hepáticas, considerando as quantificações obtidas relacionadas às expressões foram avaliadas à partir do modelo especificado a seguir:

$$Y_{ij} = \mu + M_i + e_{ij}$$

Em que,

Y_{ij} é o valor fenotípico das quantificações obtidas relacionadas às expressões gênicas (em Ct);

μ é uma constante inerente a todas as observações;

M_i é o efeito fixo dos tratamentos para as enzimas hepáticas (CYP2C e CYP3A)

e_{ij} = efeito aleatório residual associado a característica Y_{ij} , $e_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma_e^2)$

As equações utilizadas para ilustrarem os métodos de quantificação relativa assim como a equação direta de Ct foram implementadas via SAS (*Statistical Analysis System*) versão 2000. As análises de variâncias foram obtidas via o procedimento *PROC GLM* do SAS (2000). Em seguida os dados foram submetidos ao teste Tukey e a diferença entre os tratamentos foi considerada significativa se os valores de probabilidade de $P < 0,05$.

Todas as comparações estatísticas foram realizadas sobre as médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos com uma aproximação do teste de qui-quadrado e estão

apresentadas na forma de médias e erros-padrão (EP) com as distribuições nas escalas originais, pois estas podem ser facilmente interpretadas.

9. RESULTADOS

O grupo que recebeu dieta *ad libitum* teve consumo alimentar e uma média de ganho de peso superior ($P < 0,0001$) ao do grupo que recebeu dieta restrita (Tabela 4; Figura 13 e Figura 14).

TABELA 4. Média dos quadrados mínimos \pm EP do consumo diário alimentar (kg/animal/d) e ganho médio semanal de peso corporal (kg) para o grupo de dieta *ad libitum* e dieta restrita respectivamente, durante todo o período experimental (8 semanas).

	<i>Ad libitum</i> (n=24)	Restrita (n=24)	P
Ganho Médio Semanal de Peso (kg)	1,28 \pm 0,09	-0,002 \pm 0,09	0,0001
Consumo (kg/animal/dia)	1,80 \pm 0,03	0,56 \pm 0,004	0,0001

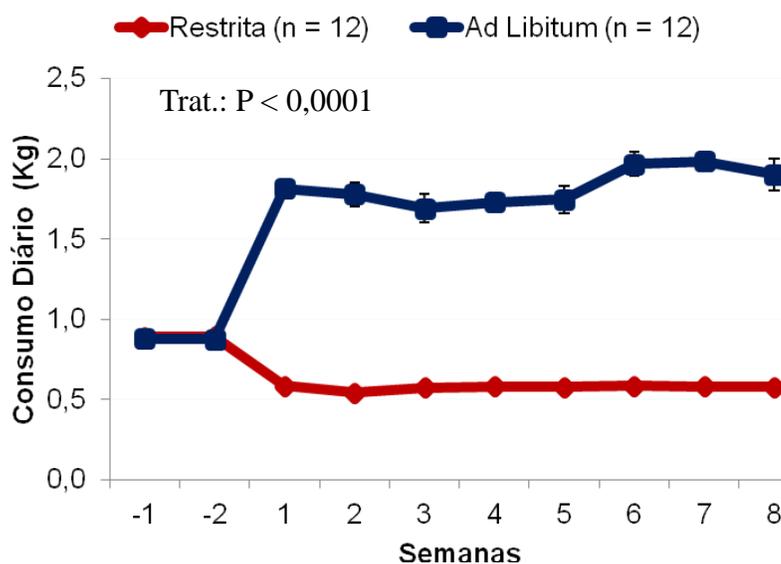


FIGURA 13. Consumo diário de ração total de acordo com os tratamentos: Ad Libitum (3,8 % de matéria seca por Kg de peso corporal) e Restrita (2,0 % de matéria seca por Kg de peso corporal) durante o período experimental.

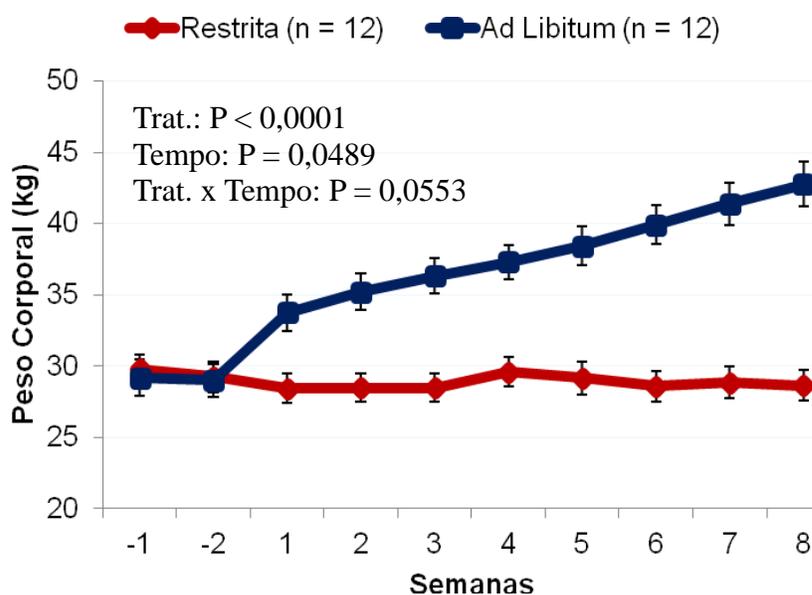


FIGURA 14. Peso corporal (kg) durante as semanas experimentais dos animais recebendo dieta Ad Libitum (3,8 % de matéria seca por Kg de peso corporal) e Restrita (2,0 % de matéria seca por Kg de peso corporal).

Durante o período de adaptação, antes de iniciar as dietas experimentais, o pico plasmático pós-prandial de insulina ocorreu 1 h após a ingestão alimentar, atingindo $13,86 \pm 2,33 \mu\text{UI/mL}$ (Figura 13).

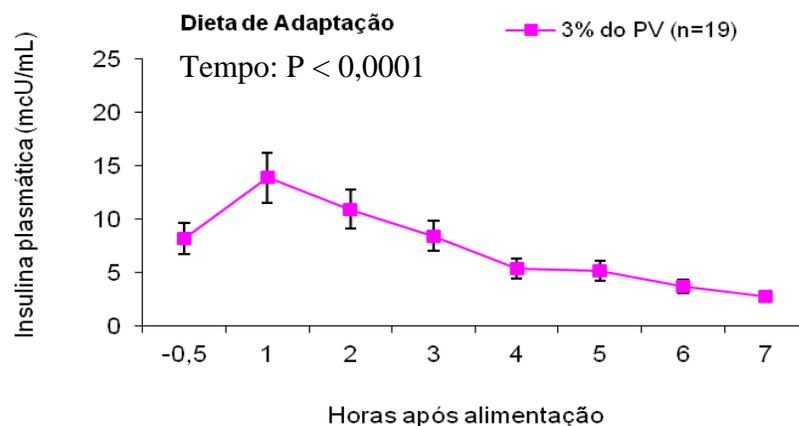


FIGURA 15. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações séricas de insulina ($\mu\text{UI/mL}$) durante o período de adaptação (15 dias; 3% de matéria seca por kg de peso corporal).

As concentrações plasmáticas de insulina durante todo o período experimental foram maiores para o grupo que recebeu dieta *ad libitum* em relação ao grupo que recebeu dieta restrita (Tabela 5).

TABELA 5. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações circulantes de insulina ($\mu\text{UI/mL}$) coletadas antes (-0,5h) e após ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas que receberam dieta *ad libitum* (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal), durante todo o período experimental, sendo uma coleta realizada ao final da quarta semana e a outra ao final da oitava semana.

	<i>Ad libitum</i> (n = 10)	Restrita (n = 11)	P
4 semanas	$8,15 \pm 0,93$	$1,46 \pm 0,16$	0,0001
8 semanas	$11,95 \pm 1,02$	$2,19 \pm 0,18$	0,0001

Ao final da quarta semana experimental não foi detectada interação entre tratamento e hora ($P = 0,30$), para concentrações plasmáticas de insulina, independentemente do tratamento nutricional (Figura 16).

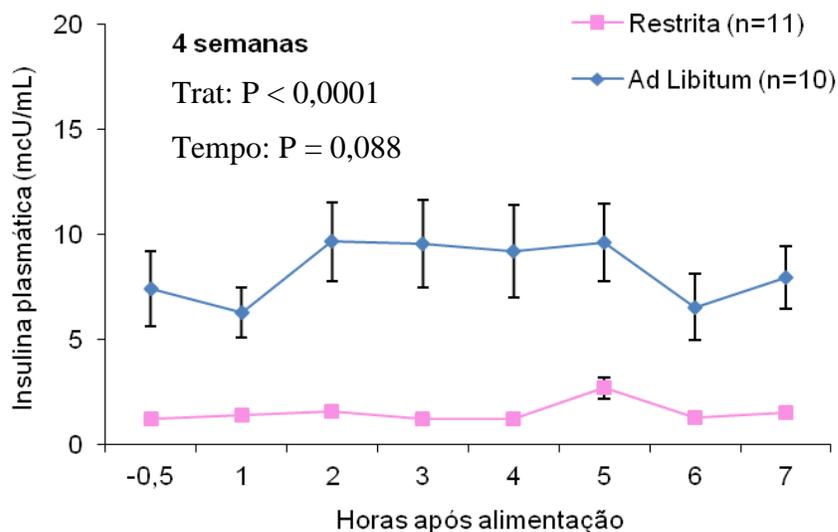


FIGURA 16. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações plasmáticas de insulina ($\mu\text{UI}/\text{mL}$) realizadas antes (-0,5 h) e após a ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas submetidas à dieta *ad libitum* (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal) ao final das primeiras 4 semanas experimentais.

Entretanto, ao final da oitava semana, observou-se uma interação entre tratamento e hora ($P = 0,019$) no grupo de dieta restrita entre 5 e 6 horas ($P = 0,015$; Figura 17).

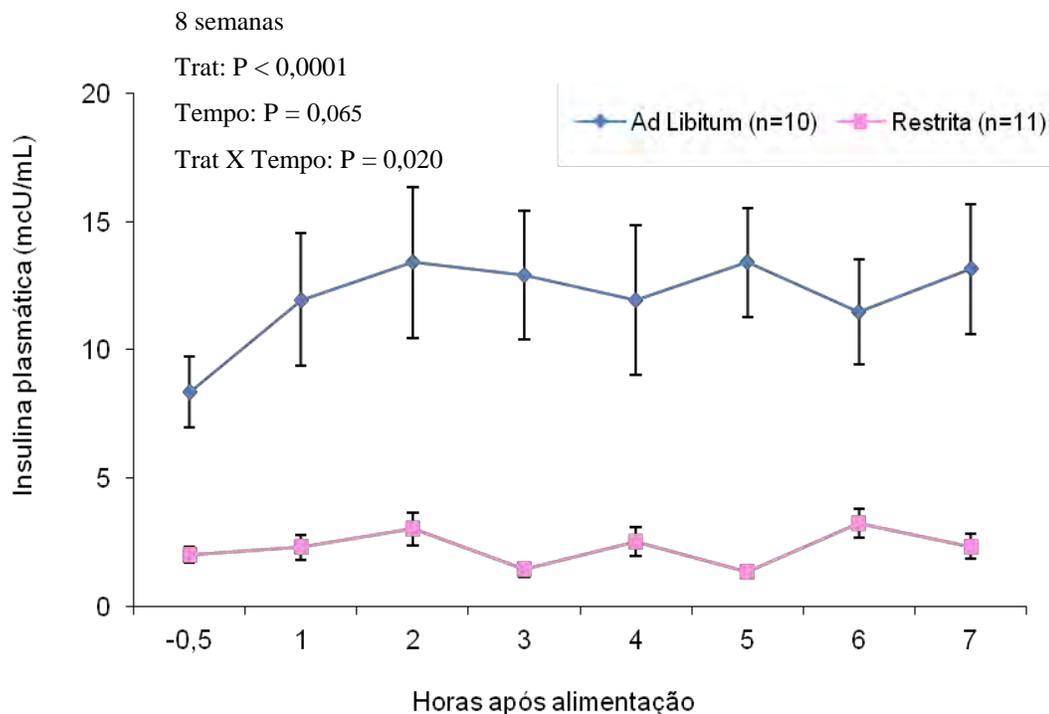


FIGURA 17. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações plasmáticas de insulina (μ UI/mL) realizadas antes (- 0,5h) e após a ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas submetidas à dieta *ad libitum* (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal) ao final do experimento (8 semanas).

Concentrações plasmáticas de P_4 durante todo o período experimental foram menores para o grupo que recebeu dieta *ad libitum* quando comparado ao grupo de dieta restrita (Tabela 6).

TABELA 6. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações plasmáticas de P4 (ng/mL) coletadas antes (-0,5h) e após ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas submetidas à dieta *ad libitum* (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal), durante todo o período experimental, sendo uma coleta realizada ao final da quarta semana e a outra ao final da oitava semana.

	<i>Ad libitum</i> (n = 10)	Restrita (n = 10)	P
4 semanas	3,21 \pm 0,32	5,53 \pm 0,32	0,0001
8 semanas	2,82 \pm 0,28	5,17 \pm 0,28	0,0001

Não houve interação entre tratamento e hora ao final da quarta semana ($P = 0,11$), nem ao final da oitava semana ($P = 0,31$; Figuras 18 e 19).

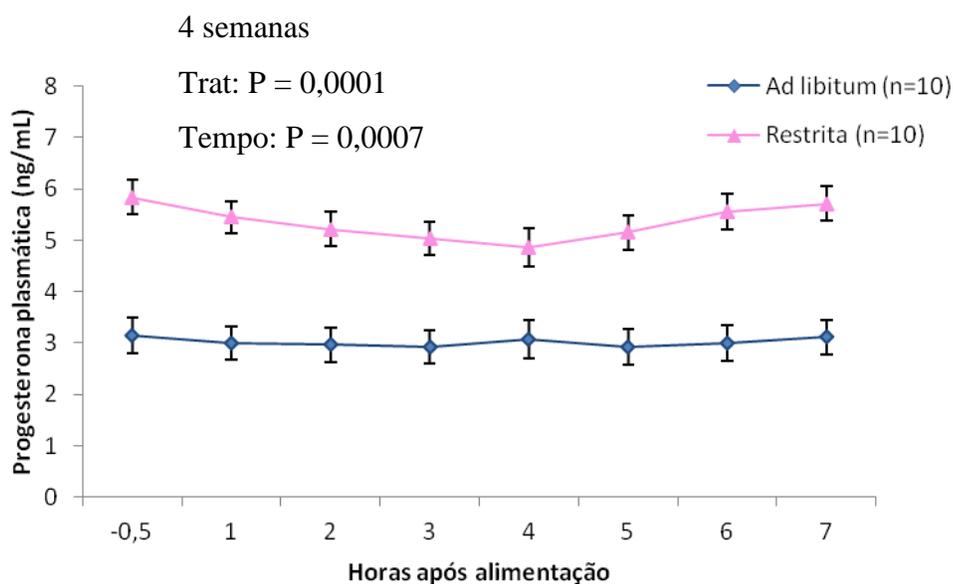


FIGURA 18. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) realizadas antes (-0,5 h) e após a ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas submetidas à dieta *ad libitum* (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal) ao final das primeiras 4 semanas experimentais.

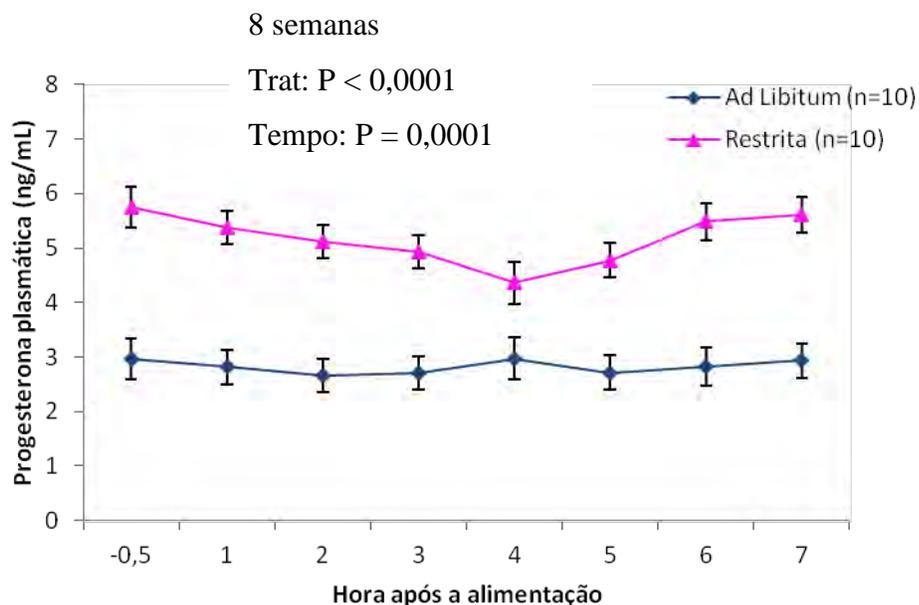


FIGURA 19. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) realizadas antes (-0,5 h) e após a ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas submetidas à dieta *ad libitum* (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal) ao final do experimento (8 semanas).

Não houve efeito de tratamento dietético após a ingestão alimentar ao final da quarta e oitava semana na expressão de RNAm de CYP2C, CYP3A, AKR1C e AKR1D ($P > 0,05$; Tabela 7 e Figuras 20, 21, 22 e 23).

TABELA 7. Expressão relativa de RNAm de CYP2C19 , CYP3A4, AKR1C4 e AKR1D1 às 4 h após o fornecimento de dieta *ad libitum* (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal) ao final da quarta e oitava semana experimental¹

Enzimas	<u>4 semanas (n=21)</u>			<u>8 semanas (n=21)</u>		
	<i>Ad libitum</i>	Restrita	<i>P</i>	<i>Ad libitum</i>	Restrita	<i>P</i>
CYP2C19	18,60 ± 0,66	18,62 ± 0,64	0,98	17,59 ± 0,33	18,45 ± 0,32	0,06
CYP3A4	16,47 ± 0,50	16,25 ± 0,49	0,74	15,69 ± 0,29	16,11 ± 0,28	0,29
AKR1C4	17,88 ± 0,37	17,81 ± 0,37	0,88	16,66 ± 0,29	16,75 ± 0,29	0,81
AKR1D1	21,29 ± 0,47	20,93 ± 0,47	0,57	20,45 ± 0,28	20,02 ± 0,28	0,26

¹Biópsias de fígado, para investigação da expressão do RNAm, foram feitas às 4h após o fornecimento da dieta.

²Valores estão expressos em *Threshold Cycle* (CT): é o número de ciclos necessários para o início da amplificação da sequência gênica-alvo presente no DNA de cada amostra; ou seja, durante a amplificação é construído um gráfico no lightcycler relacionando em tempo real os ciclos de termociclagem com a intensidade de fluorescência emitida durante a amplificação do DNA nas amostras, ciclo a ciclo. Equação utilizada para correção dos valores: $\text{Log}(e^{ct}; 2)$.

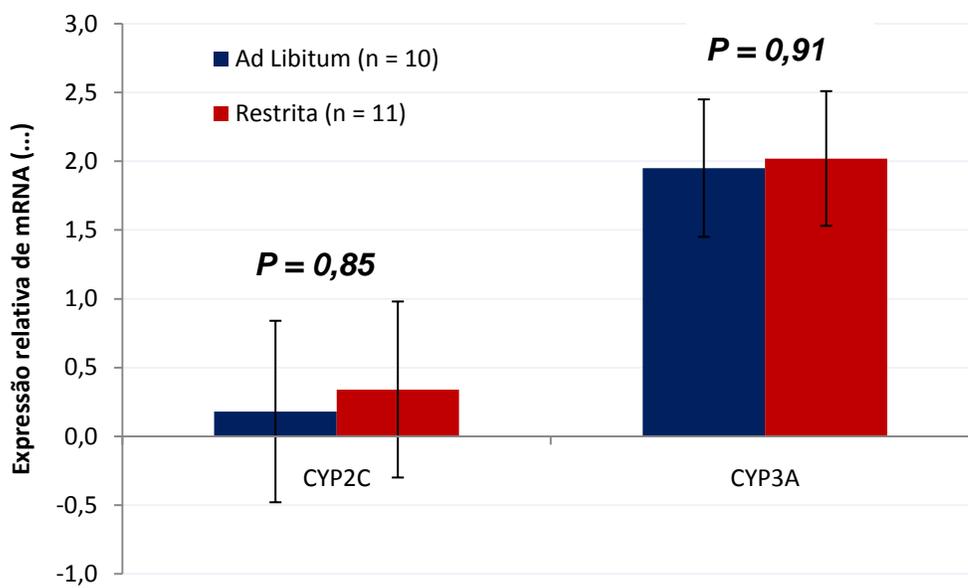


FIGURA 20. Expressão relativa das enzimas hepáticas Citocromo P450 2C e 3A em borregas 4 semanas após o início dos tratamentos. Genes de referência: GAPDH, PPIA, ATPase, RPL19 e β -actina.

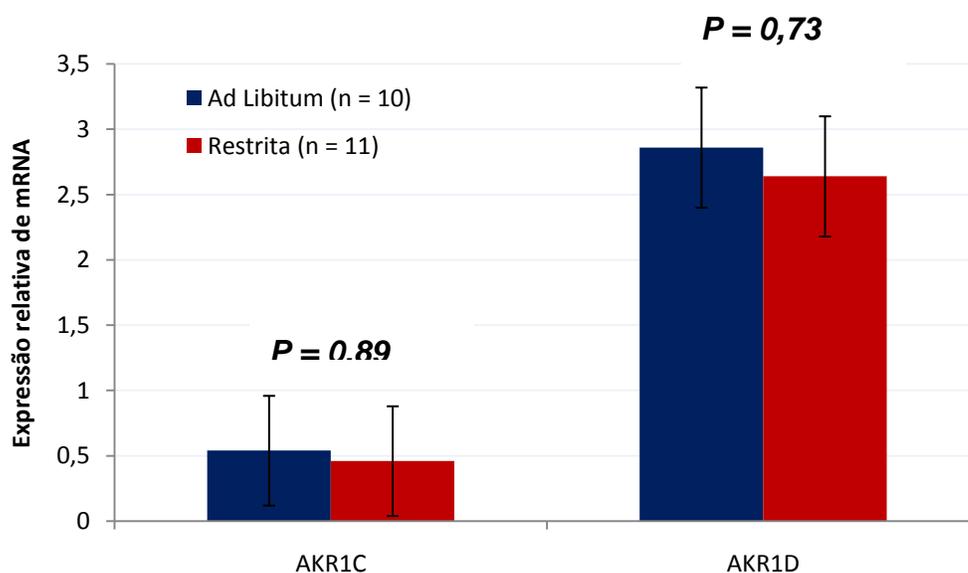


FIGURA 21. Expressão relativa das enzimas hepáticas AKR1C e AKR1D em borregas 4 semanas após o início dos tratamentos. Genes de referência: GAPDH, PPIA, ATPase, RPL19 e β -actina.

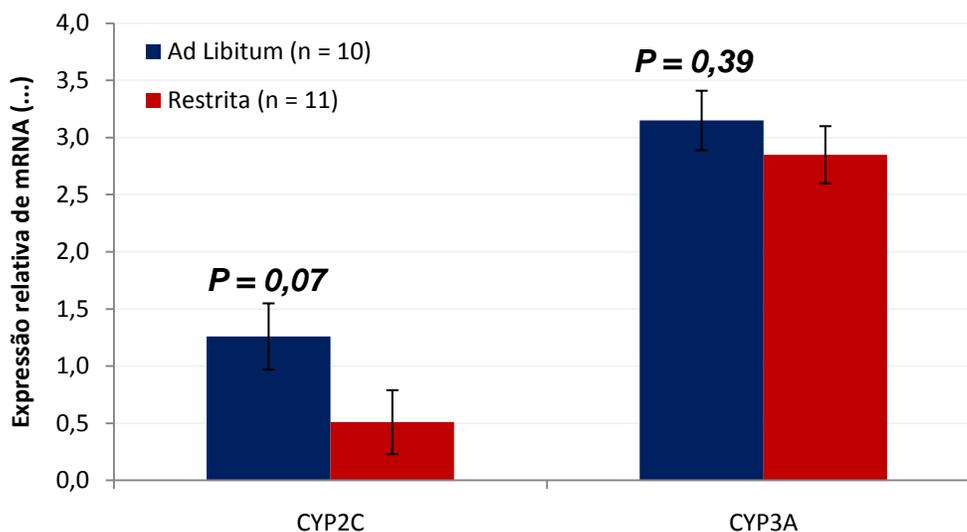


FIGURA 22. Expressão relativa das enzimas hepáticas Citocromo P450 2C e 3A em borregas 8 semanas após o início dos tratamentos. Genes de referência: GAPDH, PPIA, ATPase, RPL19 e β -actina.

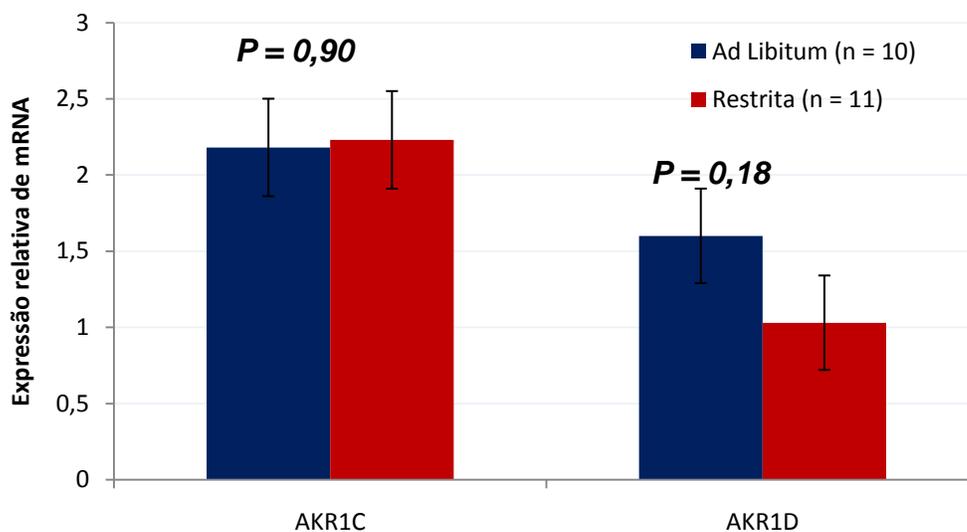


FIGURA 23. Expressão relativa das enzimas hepáticas AKR1C e AKR1D em borregas 8 semanas após o início dos tratamentos. Genes de referência: GAPDH, PPIA, ATPase, RPL19 e β -actina.

10. DISCUSSÃO

Concentrações plasmáticas de insulina durante todo o período experimental foram maiores no Grupo *Ad libitum* do que no Restrito, o que era esperado devido a alta IMS nesse grupo, pois sabe-se que a insulina atua como um sinal do estado energético para o sistema nervoso central, ou seja, as concentrações séricas de insulina estão associadas a ingestão de nutrientes (BUTLER et al., 2004; SCHWARTZ et al., 2000).

Alguns trabalhos demonstraram que dietas insulinêmicas, que disponibilizam maiores quantidades de acetato e propionato no rúmen, induzem ao aumento das concentrações plasmáticas de insulina (BERGMAN et al., 1990). Sabe-se que o propionato é um importante precursor para a gliconeogênese no fígado, aumentando assim a disponibilidade de energia, resultando em um melhor desempenho reprodutivo em vacas leiteiras (GONG et al., 2002; BUTLER et al., 2004), estimulando a liberação de GnRH e a esteroidogênese (ARIAS et al., 1992; BEAM & BUTLER 1999).

Carboidratos são importantes fontes de energia. Em ruminantes são convertidos em ácidos graxos de cadeia curta, como resultado da fermentação microbiana, estimulando assim a secreção de insulina pelo pâncreas (DE JONG et al., 1982). Corroborando nosso trabalho, diversos estudos mostraram o efeito da alta IMS ou dietas isoenergéticas nas concentrações circulantes de insulina (BUTLER et al., 2004; LEMLEY et al., 2008; MORIEL et al., 2008).

Durante o período de adaptação, em que as ovelhas recebiam dieta de manutenção (3% do PC), o pico pós-prandial insulinêmico ocorreu 1 h após ingestão alimentar. Entretanto o mesmo não foi observado ao final da quarta e oitava semana para o grupo *Ad Libitum* e Restrito, pois ovelhas do grupo *Ad libitum* recebiam dieta a vontade, ou seja, não houve controle total do momento da ingestão. Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa entre as horas em cada grupo (interação) observou-se um aumento nas concentrações plasmáticas de insulina entre 2 e 5 h após o fornecimento da dieta, semelhantes a estudos anteriores em que vacas tratadas com glicose tiveram maiores concentrações plasmáticas de insulina às 3 h pós-infusão do que em vacas que receberam salina (VIEIRA, 2012). Em vacas não lactantes (Girolando), também foi observado um aumento a partir de 2 h após a ingestão alimentar (MORIEL et al., 2008).

De acordo com Parr et al. (1993a,b) existe uma relação inversa entre o nível de ingestão alimentar e concentrações plasmáticas de P_4 em ovelhas. No presente estudo, ovelhas que receberam dieta *Ad libitum* apresentaram maiores concentrações circulantes de insulina, entretanto neste mesmo grupo foram observadas muito menores concentrações circulantes de P_4 , aparentemente justificado pelo elevado metabolismo de P_4 em consequência de um maior fluxo sanguíneo hepático (PARR et al. 1987; SANGSRITAVONG et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003).

Smith et al. (2006) mostraram que o propionato é mais eficiente que o acetato, em aumentar os níveis circulantes de insulina e também em reduzir a metabolização da P_4 . Dessa forma, pode-se sugerir que a composição e não só o volume da dieta fornecida pode atenuar a metabolização da P_4 e manter suas concentrações circulantes mais elevadas, uma vez que é sabido que dietas ricas em carboidratos solúveis são mais eficientes em disponibilizar propionato aos ruminantes (BERGMAN et al., 1990). Entretanto, de acordo com Niswender (2000), grande parte da P_4 circulante é inativada ou catabolizada no fígado, portanto qualquer aumento na taxa de fluxo de sangue para o fígado irá produzir um aumento na taxa de metabolismo de P_4 , o que pode explicar parte dos resultados obtidos até aqui.

A P_4 circulante é inativada ou catabolizada nos hepatócitos pelas enzimas citocromo P450 2C (CYP2C) e citocromo P450 3A (CYP3A), e os principais metabólitos são a 21-hidroxiprogesterona e a 6 β -hidroxiprogesterona, respectivamente (MURRAY, 1991, 1992). Além das CYPs há outra via de catabolismo através das Aldo AKRs, principalmente a AKR1C e AKR1D. As AKRs são enzimas importantes que atuam junto com as CYPs na primeira fase da biotransformação dos esteróides. Alguns trabalhos sugerem que a insulina parece ser um inibidor da expressão do gene e proteína para as enzimas CYP2C, CYP3A, AKR1C e AKR1D em fígado de bovino e ovino (LEMLEY et al., 2008a; LEMLEY et al., 2010), entretanto neste estudo estes efeitos não foram observados. Expressão de RNAm de CYP2C, CYP3A, AKR1C e AKR1D não foi afetada após a ingestão alimentar, ao final da quarta e oitava semana para ovelhas do grupo *Ad libitum* e restrito. Entretanto, contrariando alguns trabalhos, Vieira (2012) observou um aumento na expressão da CYP3A no grupo que recebeu infusão de glicose, ou seja, o grupo que apresentava maiores concentrações sanguíneas de insulina.

Por outro lado, a maioria dos trabalhos baseou-se em cultivo de hepatócitos *in vitro* ou na infusão de insulina, propilenoglicol ou propionato (SMITH et al., 2006; LEMLEY et al., 2007; LEMLEY et al., 2008a). No estudo de Lemley et al. (2008a), foi observado que mesmo com o aumento de 30% de insulina para vacas que recebiam propilenoglicol, expressão de RNAm de CYP2C em vacas recebendo água ou propilenoglicol não diferiu entre os tratamentos, entretanto houve diminuição de 40% na quantidade de RNAm de CYP3A. Neste mesmo trabalho, conforme insulina era infundida i.v. (1,0 g de insulina/kg de PV/h), houve diminuição na expressão de ambas as enzimas CYP2C (88%) e CYP3A (45%), respectivamente. No entanto, em outro estudo realizado por Lemley et al. (2010), curiosamente apesar das concentrações plasmáticas de insulina não terem sido diferentes entre as dietas experimentais (alto grão X alta fibra) no momento da biópsia hepática (3,7 h pós-alimentação), foi observado um aumento de 22% nas concentrações de insulina no grupo que recebeu alto grão durante o período de coleta de sangue (10 h). Entretanto, neste estudo a expressão das enzimas CYP2C e CYP3A não diferiu entre as duas dietas experimentais.

Desta forma, ainda não está totalmente definido se o aumento nas concentrações de insulina *in vivo* causado pela maior ingestão de matéria seca e/ou energia é suficiente para reduzir a expressão das enzimas hepáticas CYP2C e CYP3A, AKR1C e AKR1D reduzindo assim o metabolismo da P₄.

11. CONCLUSÕES

Após a realização deste estudo foi possível concluir que, de fato, a dramática redução na P₄ circulante após a alimentação *ad libitum* em relação às ovelhas com restrição alimentar, ocorreu, muito provavelmente, devido ao elevado metabolismo de P₄ em consequência de um maior fluxo sanguíneo hepático causado pela maior ingestão alimentar.

Entretanto, apesar de alguns estudos sugerirem que a insulina tem um efeito inibitório na expressão das enzimas hepáticas responsáveis pelo metabolismo da P₄, reduzindo assim o metabolismo deste hormônio e aumentando suas concentrações circulantes, neste estudo foi observado um efeito nulo, para expressão das enzimas hepáticas.

12. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados neste estudo não corroboraram estudos prévios que mostraram que o aumento da insulina reduz a expressão das enzimas hepáticas responsáveis pelo metabolismo dos hormônios esteróides. Caso esse efeito tivesse sido confirmado, teríamos uma estratégia bastante interessante para aumentar as concentrações circulantes de progesterona através da manipulação da dieta.

Mas contrariamente ao esperado, encontramos que a insulina não teve efeito inibitório sobre as enzimas hepáticas. No entanto, é preciso buscar maiores informações a respeito do efeito da insulina, visto que os resultados encontrados neste estudo são contrários aos de trabalhos publicados previamente. Além disso, outros estudos ainda precisam ser desenvolvidos para que seja possível saber se a insulina está, de fato, alterando a atividade das enzimas hepáticas. Uma vez que o aumento da expressão das enzimas não necessariamente resulta em aumento da atividade das mesmas.

Este estudo trouxe resultados bastante interessantes e o desenvolvimento do mesmo proporcionou um grande crescimento pessoal e profissional de todas as pessoas envolvidas. Através dele foi possível o aprendizado de novas técnicas e de diversos conceitos e teorias que, com certeza, contribuirão muito com o futuro profissional na área de reprodução animal.

13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C; GINTHER, O.J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.94, p.177-188, 1992.

AHMAD, N.; SCHRICK, F.N.; BUTCHER, R.L.; INSKEEP, E.K. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biology of Reproduction*, v.52, p.1129-1135, 1995.

ARIAS, P.; RODRIGUEZ, M.; SZWARCFARB, B.; SINAY, I.R.; MOGUILEVSKY, J.A. Effect of insulin on LHRH release by perfused hypothalamic fragments. *Neuroendocrinology*, v. 56, p. 415-418,1992.

ARMSTRONG, D.G.; MCEVOY, T.G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J.J.; HOGG, C.O.; WOAD, K.J.; WEBB, R. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biology of Reproduction*, v.64, p.1624-32, 2001.

BEAM, S.W.; and BUTLER, W.R. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 54, p. 411-424, 1999.

BODENSTEINER, K.J.; WILTBANK, M.C.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology*, v.45, p. 499-512, 1996.

BOSSIS,I.; WETTEMANN, R. P.; WELTY, S. D.; VIZCARRA, J. A.; SPICER, L. J.; DISKIN, M. G. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *Journal of Animal Science*, v.77, p.1536-1546, 1999.

BOWALGAHA, K.; ELLIOT, D.J.; MACKENZIE, P.I.; KNIGHTS, K.M.; MINERS, J.O. 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.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGERTT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, p. 611-22, 2009.

BUTLER, W. R. Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in post-partum dairy cows. *Animal Science*, v.26, p.133-145, 2001.

BUTLER, W.R.; MARR, A.L.; PELTON, S.H.; RADCLIFF, R.P.; LUCY, M.C. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *Journal Endocrinology*, v. 176, p.205-217, 2003.

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.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M.A.; EVANS, A.C.; KENNY, D.A.; ROCHE, J.F.; LONERGAN, P. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reproduction, Fertility and Development*, v.20, p.368-375, 2008.

DE JONG, A. Patterns of plasma concentrations of insulin and glucagon after intravascular and intraruminal administration of volatile fatty acids in the goat. *Journal Endocrinology*, v. 92, p. 357-370, 1982.

FONSECA, F.A; BRITT, J.H; MCDANIEL, B.T; WILK, J.C; RAKES, A.H. Reproductive traits of holsteins and jersey's-effects of age, milkyield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection on estrus, conception rate, and days open. *Journal of Dairy Science*, v.66, p.1128-1147, 1983.

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

GONG J.G.; LEE W.J.; GARNSWORTHY P.C.; WEBB R. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early post-partum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction*, v.123, p.419-27, 2002a.

GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology*, v.57, p.1591-1602, 2002b.

HADLEY, M.E. Hormones and female reproductive physiology. In: HADLEY, M.E. *Endocrinology*. Arizona/EUA: Prentice-Hall do Brasil, Ltda. p. 476-503, 1992.

JIN, Yi.; MESAROS, C.;BLAIR, I.A. and PENNING, T.M. Stereospecific reduction of 5 β -reduced steroids by human ketosteroid reductases of the AKR (aldo-keto reductase) superfamily: role of AKR1C1–AKR1C4 in the metabolism of testosterone and progesterone via the 5 β -reductase pathway. *Biochemical Journal*, v. 437, p.53-61, 2011.

KLEEMANN, D.O.; WALKER, S.K.; SEAMARK, R.F. Enhanced fetal growth in sheep administered progesterone during the first three days of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.102, p.411-417, 1994.

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 11/01/2012.

LEMLEY, C. O.; Koch, J. M.; Blemings, K. P.; Krause, K. M. and Wilson, M. E. 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, p. 1223-1229, 2008a.

LEMLEY, C. O.; BUTLER, S. T.; BUTLER, W. R. and WILSON, M. E. 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, 2008b.

LEMLEY, C.O.; KOCH, J.M.; BLEMININGS, K.P.; WILSON, M.E. 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. 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, 2010a.

LEMLEY, C. O.; VONNAHME, K. A.; TAGER, L. R.; KRAUSE, K. M. AND WILSON, M. E. Diet-induced alterations in hepatic progesterone (P4) catabolic enzyme activity and P4 clearance rate in lactating dairy cows. *Journal of Endocrinology*, v. 205, p. 233-241, 2010b.

LONERGAN, P.; WOODS, A.; FAIR, T.; CARTER, F.; RIZOS, D.; WARD, F.; QUINN, K.; EVANS, A. Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, v.19, p.861-868, 2007.

LOPEZ, H.; SATTER, L.D.; WILTBANK, M.C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v.81, p.209-223, 2004.

MARTINS, A. C.; MOLLO, M. R.; BASTOS, M. R.; GUARDIEIRO, M. M.; SARTORI, R. Concentrações séricas hormonais em vacas azebuadas submetidas à baixa e alta ingestão alimentar. *Pesquisa agropecuária brasileira*, vol.43, no.2, p.243-247, 2008.

MORIEL, P.; SCATENA, T. S.; SÁ FILHO, O. G.; COOKE, R. F. and VASCONCELOS, J. L. M. 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.

MOLLO, M.R.; RUMPF, R.; MARTINS, A.C.; MATTOS, M.C.C.; LOPES JR, C.; CARRIJO, L.H.D., SARTORI, R. Função ovariana em novilhas Nelore submetidas a alta ou baixa ingestão alimentar. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35 (Supl 3), p.958, 2007.

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. *J. Steroid Biochem. 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. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*, v.43, p.591–593, 1992.

MURPHY, M. G.; ENRIGHT, W. J.; CROWE, M. A.; MCCONNELL, K.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Effect of dietary-intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous-cycle in beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.92, p.333-338, 1991.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYSON, M.K.; McINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*. v. 80, 2000.

PARR, R. A.; CUMMING, I. A.; CLARKE, I. J. Effects of maternal nutrition and plasma progesterone concentrations on survival and growth of the sheep embryo in early gestation. *J. Agric. Sci.* v.98, p.39-46, 1982.

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

PARR, R.A.; DAVIS, I.F.; MILES, M.A.; SQUIRES, T.J. Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Research in Veterinary Science*, v.55, p. 306-310, 1993a.

PARR, R.A.; DAVIS, I.F.; MILES, M.A.; SQUIRES, T.J. Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Research in Veterinary Science*, v.55, p.311-316, 1993b.

PENNING, T. M., BURCZYNSKI, M. E., JEZ, J. M., HUNG, C., LIN, H., MA, H., MOORE, M., PALACKAL, N. and RATNAM, K. 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. *Journal Biochemistry*, v.351, p.67-77, 2000.

PFEIFER, L.F.M.; SARTORI, R.; PIVATO, I.; RUMPF, R.; NOGUEIRA, G.P.; XAVIER, E.G.; DIONELLO, N.J.L.; CORRÊA, M.N. Effect of circulating progesterone on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Animal reproduction*, v.6, p.473-480, 2009.

PORETSKY, L.; KALIN, M.F. The gonadotropic function of insulin. *Endocrine Reviews*, v.8, p. 132-141, 1987.

REVAH, I.; BUTLER, W.R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.106, p.39-47, 1996.

ROBERSON, M.S.; WOLFE, M.W.; STUMPF, T.T.; KITTOCK, R.J.; KINDER, J.E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biology of Reproduction*, v.41, p.997-1003, 1989.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D.K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L.E.; WILTBANK, M.C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17B in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.2831-42, 2002.

SARTORI, R., ROSA, G. J. M., AND WILTBANK, M. C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, v.85, 2813 – 2822, 2002.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p.905-920, 2004.

SCHWARTZ, M.W.; WOODS, S.C.; PORTE, D.Jr.; SEELEY, R.J.; BASKIN, D.G. Central nervous system control of food intake. *Nature*, v. 404, p. 661-671, 2000.

SMITH, D. L.; STINEFELT, B. M.; BLEMININGS, K. P. and WILSON, M. E. Diet-induced alterations in progesterone clearance appear to be mediated by insulin signaling in hepatocytes. *Journal Animal Science*, v.84, p.1102–1109, 2006.

STABENFELDT, G.H.; EDQVIST, L.E. Female reproductive processes. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. *Dukes Physiology of domestic animals*. New York/EUA, p. 678-710, 1993.

UDVARDI, M.K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W.R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*, v. 20, 2008.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3: Research0034, 2002.

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

VIEIRA, F.V.R. Infusão intravenosa de glicose e balanço energético na expressão de enzimas hepáticas responsáveis pelo catabolismo de progesterona em bovinos. Tese de Mestrado. Unesp, Botucatu, 2012.

WAXMAN, D.J.; LAPENSON, D.P.; AOYAMA, T.; GELBOIN, H.V.; GONZALEZ, F. J.; KORZEKWAT, K. Steroid Hormone Hydroxylase Specificities of Eleven cDNA-Expressed Human Cytochrome P450s. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 290, p. 160-166, 1991.

WEBB, R; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*, v.82 (Supl), p.E63-E74, 2004.

WILTBANK, M. C.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GUMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, 2006.

WILTBANK, M.C.; SOUZA, A.H.; GIORDANO, J.O.; NASCIMENTO, A.B.; VASCONCELOS, J.M.; PEREIRA, M.H.C.; FRICKE, P.M.; SURJUS, R.S.; MATTOS, F.C.S.Z.; CARVALHO, P.D.; BENDER, R.W.; SARTORI, R. Positive and Negative Effects of Progesterone during Timed AI Protocols in Lactating Dairy Cattle. *Animal Reproduction*. No prelo.

WOLFENSON, D.; INBAR, G.; ROTH, Z.; KAIM, M.; BLOCH, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*, v.62, p.1042-1055, 2004.

XU, Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reproduction*. v. 53, p. 951-957, 1995.

YUAN, R., MADANI, S., WEI, X. X., REYNOLDS, K., and HUANG, S. M. Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. *Drug Metab Dispos* 30(12), p.1311-1319, 2002.

ZAROS, L.G.; BRICARELLO, P.A.; AMARANTE, A.F.T.; COUTINHO, L.L. Quantification of bovine cytokine gene expression using real-time rt-pcr methodology. *Genetic and Molecular Biology*, v. 30, p. 575- 579, 2007.

14. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho submetido para a revista *Ciência Animal Brasileira*.

INFLUÊNCIA DA INGESTÃO ALIMENTAR NAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE INSULINA E PROGESTERONA, E NA EXPRESSÃO DE ENZIMAS HEPÁTICAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE PROGESTERONA EM OVELHAS PRÉ-PÚBERES

Resumo

O objetivo deste experimento foi avaliar a influência da ingestão alimentar nas concentrações plasmáticas de insulina e progesterona (P4) e na expressão das enzimas hepáticas Citocromo P450 2C (CYP2C) e Citocromo P450 3A (CYP3A) responsáveis pelo metabolismo de P4, em ovelhas pré-púberes. Borregas (n=24) F1 Dorper X Santa Inês, com idade média de 5 m e peso corporal (PC) médio de 29,4 kg foram confinadas em baias individuais. As ovelhas foram distribuídas em blocos de acordo com o PC inicial e divididas em dois grupos: Grupo *Ad libitum* (Ad), com ingestão média de 3,8% de matéria seca (MS) por kg de PC e Grupo Restrição (R), com 2,0% de MS por kg de PC. O estudo teve duração de 10 semanas, sendo 2 semanas de adaptação em manutenção e 8 semanas nas dietas experimentais. Ao final da quarta (S4) e da oitava semanas experimentais (S8), os animais receberam um dispositivo intravaginal de liberação de P4 (0,33 g de P4, CIDR, Pfizer), caracterizando o D0. Dinoprost (PGF_{2α}, 10 mg, i.m., Lutalyse, Pfizer) foi aplicado no D0 e D6. No D8, sangue foi colhido às -0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 h em relação ao fornecimento da dieta (0 h). Dosagens de insulina e P4 plasmáticas foram feitas por meio de radioimunoensaio. No D9, 4 h após a oferta da dieta, foi realizada biópsia hepática e o material foi preservado em RNA later (Invitrogen, EUA) para análise de expressão gênica (mRNA) por PCR quantitativo em tempo real. O consumo diário alimentar foi de 1,8±0,04 e 0,6±0,01 kg/animal/d para o Grupo Ad e R, respectivamente (P<0,001). O grupo Ad teve um ganho médio semanal de 1,3±0,09 kg e o grupo R não teve alteração de PC (P<0001). As concentrações de insulina foram maiores no Grupo Ad em relação ao Grupo R (8,2±0,94 vs. 1,5±0,16 e 12,0±1,03 vs. 2,2±0,19 µUI/mL ao final da S4 e S8, respectivamente; P<0,0001). O Grupo Ad apresentou menor (P<0,0001) P4 plasmática do que o Grupo R tanto ao final da S4 (3,2±0,32 vs. 5,5±0,32 ng/mL), quanto da S8 (2,8±0,29 vs. 5,2±0,29 ng/mL). A enzima CYP2C foi 1,8 vezes mais expressa no grupo Ad comparada ao grupo R na S8 (P=0,07). Entretanto, não houve diferença entre os tratamentos tanto para a CYP2C na S4, quanto para CYP3A na S4 e S8 (P>0,10). Portanto, não foi detectado efeito inibitório da insulina circulante na expressão das enzimas CYP2C e CYP3A. Provavelmente, a dramática redução na P4 circulante após a alimentação *ad libitum* em relação às ovelhas com restrição alimentar, ocorreu devido ao elevado metabolismo de P4 em consequência de um maior fluxo sanguíneo hepático.

Palavras-chave: ingestão de matéria seca, hormônios esteróides, insulina, ovino.

INFLUENCE OF FOOD INTAKE ON PLASMA CONCENTRATIONS OF INSULIN AND PROGESTERONE, AND EXPRESSION OF LIVER ENZYMES INVOLVED IN THE METABOLISM OF PROGESTERONE IN SHEEP PREPUBERTAL

Abstract

The objective of this was to evaluate the influence of feed intake on plasma insulin and progesterone (P4) concentrations and the expression of the hepatic enzymes Cytochrome P450 2C (CYP2C) and Cytochrome P450 3A (CYP3A) responsible for metabolism of P4, in prepubertal sheep. Lambs (n=24) F1 Dorper x Santa Inês, 5 m old and with an average body weight (BW) of 29.4 kg were confined in individual stalls. The sheep were blocked according to the initial BW and divided into two groups: *Ad libitum* group (Ad), with average intake of 3.8% dry matter (DM) per kg of BW and Restriction group (R) with 2.0% DM per kg BW. The study lasted 10 weeks, with 2 weeks of a maintenance diet and 8 weeks on the experimental diets. At the end of the fourth (W4) and the eighth experimental weeks (W8), the ewes received an intravaginal P4 release device (0.33 g P4, CIDR, Pfizer), designated as D0. Dinoprost (PGF_{2α}, 10 mg, im, Lutalyse, Pfizer) was used on D0 and D6. On D8, blood was collected at -0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 h in relation to the time the diet was offered (0 h). Measurements of plasma insulin and P4 were done by radioimmunoassay. At D9, 4 h after diet introduction, a liver biopsy was performed and the sample stored in RNA later (Invitrogen, USA) for analysis of gene expression (mRNA) by quantitative real time PCR. Data were analyzed using PROC GLIMMIX of SAS and were presented as least squares means ± SE. The average daily feed intake was 1.8±0.04 and 0.6±0.01 kg/animal/d for the Ad and R Group, respectively ($P<0.001$). The Ad Group had an average weekly BW gain of 1.3±0.09 kg and the R group had no change in BW ($P<0.001$). Plasma insulin concentrations were higher ($P<0.0001$) in the Ad Group compared to the R Group at the end of W4 (8.2±0.94 vs. 1.5±0.16 μIU/mL) and W8 (12.0±1.03 vs. 2.2±0.19 μIU/mL). The Ad Group had lower ($P<0.0001$) plasma P4 than Group R both at the end of W4 (3.2±0.32 vs. 5.5±0.32 ng/mL), and W8 (2.8±0.29 vs. 5.2±0.29 ng/mL). The CYP2C enzyme was 1.8 times more expressed in the Ad group compared to the R group in W8 ($P=0.07$). However, there was no difference between treatments for both CYP2C in W4, and for CYP3A in W4 and W8 ($P>0.10$). Thus, we did not find an inhibitory effect of elevated insulin on CYP2C or CYP3A. It seems likely that the dramatic decrease in circulating P4 after *ad libitum* feeding was due to elevated P4 metabolism due to a greater liver blood flow than found in ewes with feed restriction.

Keywords: Dry matter intake, steroid hormones, insulin, sheep.

Introdução

Dentre os fatores que exercem influência na reprodução, a nutrição tem um papel reconhecidamente importante por afetar diretamente aspectos da fisiologia e desempenho reprodutivo das fêmeas ruminantes. Diversos estudos discutem a influência da nutrição sobre a queda da fertilidade, principalmente em vacas leiteiras por causa da alta ingestão de matéria seca (IMS) (BUTLER, 2001; GONG et al., 2002a; WEBB et al., 2004). A redução

da eficiência reprodutiva, em animais com alta IMS, pode ser devido às alterações na concentração dos hormônios circulantes. Uma das explicações para estas menores concentrações circulantes é que a elevada IMS promove maior metabolismo dos hormônios esteróides e, conseqüentemente, menores concentrações circulantes destes hormônios (PARR et al., 1993a; SANGSRITAVONG et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003).

Sangsrivong et al. (2002) ao comparar o metabolismo de hormônios esteróides em vacas lactantes e não-lactantes em dietas de baixa e alta ingestão alimentar observaram que animais com alta ingestão alimentar apresentaram maior fluxo sanguíneo hepático e conseqüentemente maior metabolização de progesterona (P_4) e estradiol (E_2). Baixas concentrações circulantes de P_4 , devido à elevada taxa de catabolismo, podem ser responsáveis pelo aumento das perdas de prenhez, observados principalmente em vacas leiteiras de alta produção, por causa da alta IMS que esses animais precisam ter para uma maior produção de leite.

Alguns trabalhos mostraram que tanto em vacas (SARTORI et al., 2004) quanto em ovelhas (PARR et al., 1982) a alta IMS reduz as concentrações circulantes de P_4 . Em 1982, Parr e colaboradores observaram que a dieta pode influenciar na metabolização da P_4 e não, necessariamente, na sua síntese. Tais autores mostraram que ovelhas alimentadas com dieta restrita e recebendo suplementação exógena de P_4 apresentaram maiores concentrações circulantes de P_4 quando comparadas a ovelhas sob as mesmas condições, porém superalimentadas. Sartori et al. (2004) relataram que vacas lactantes apresentaram menores concentrações circulantes de P_4 do que novilhas e vacas secas. Este resultado, provavelmente, é em decorrência da maior ingestão alimentar das vacas em lactação.

Grande parte da P_4 circulante é inativada ou catabolizada nos hepatócitos pelas enzimas citocromo P450 2C (CYP2C) e citocromo P450 3A (CYP3A; MURRAY, 1991, 1992). Embora vários estudos tenham relatado que a P_4 é catabolizada principalmente por essas enzimas, alguns autores tem observado outra via de catabolismo através das enzimas Aldo-keto reductase (AKR 1C e 1D), que são enzimas semelhantes à superfamília do Citocromo P450 e atuam na primeira fase da biotransformação de esteróides (PENNING et al., 2000; JINN et al., 2011).

Alguns trabalhos sugerem que a insulina inibiu a expressão destas enzimas, reduzindo assim o catabolismo hepático de P_4 (LEMLEY et al., 2008; MORIEL et al.,

2008). Lemley et al. (2008) sugeriram que a elevação nos níveis de insulina pode diminuir expressão e atividade destas enzimas hepáticas responsáveis pelo catabolismo de P₄.

A insulina atua como um sinal do estado energético para o sistema nervoso central (SCHWARTZ et al., 2000). Portanto, dietas de alta energia que disponibilizam maiores quantidades de acetato e propionato no rúmen promovem maior secreção de insulina (BERGMAN et al., 1990). Smith et al. (2006) mostraram que o propionato é mais eficiente que o acetato, para aumentar as concentrações circulantes de insulina e também para reduzir a metabolização da P₄.

Além disso, em um trabalho realizado recentemente por Lemley et al. (2010) foi observado que vacas holandesas que receberam uma dieta rica em energia apresentaram uma diminuição na atividade das enzimas hepáticas, CYP2C, CYP3A e AKR1C quando comparadas a dieta de alta fibra. Entretanto as concentrações plasmáticas de insulina e expressão das enzimas hepáticas não tiveram diferença significativa entre as dietas experimentais. Isso sugere que o tipo de energia fornecida pode modular a taxa de inativação da P₄ no fígado. Portanto, fornecer uma dieta que estimula a secreção de insulina no período pós-parto pode melhorar concentrações periféricas de P₄, principalmente nos primeiros dias após a inseminação, melhorando o desempenho reprodutivo dos animais (GONG et al., 2002).

Ainda há poucos estudos a respeito da regulação das enzimas que catabolizam a P₄ em bovinos e ovinos. Entretanto como estes mecanismos fisiológicos são muito importantes, há a necessidade de maiores investigações, uma vez que a insulina e P₄ circulantes estão associadas à função reprodutiva.

Material e Métodos

Todos os procedimentos e protocolos envolvendo a utilização de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisas (CEUAP/ESALQ-USP; protocolo n°: 2010-4) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNESP; protocolo n°: 104/2010).

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal em parceria com o Sistema Intensivo de Produção de Ovinos e Caprinos (SIPOC) do Departamento de

Zootecnia (LZT) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Piracicaba, SP, Brasil.

Animais e Dietas

Foram utilizadas 24 borregas pré-púberes, F1 Dorper x Santa Inês, com idade média de 5 meses, confinadas em 24 baias de alvenaria individuais. Após 15 dias da fase de adaptação, os animais foram divididos em blocos de acordo com o peso corporal (PC) inicial e dentro dos blocos, aleatoriamente designados aos dois grupos experimentais baseados no fornecimento de alimento: dieta *ad libitum* e dieta restrita. A dieta restrita foi formulada para que as borregas, apesar de estarem em fase de crescimento, mantivessem o mesmo PC durante todo o período de estudo.

Os grupos permaneceram recebendo as dietas por um período de 8 semanas. Os animais receberam fornecimento da mesma dieta, baseada em recomendações do NRC (2000), constituída de 90% de concentrado e 10% de volumoso (Tabela 1), com alteração apenas na quantidade fornecida. Metade das borregas recebeu alimentação com ingestão diária de 2% de matéria seca por kg de PC (dieta restrita) e a outra metade recebeu fornecimento de dieta à vontade, com expectativa de ingestão diária de 3,8% de matéria seca por kg de PC (dieta *ad libitum*). Além disso, todos os animais tiveram acesso livre à água. Diariamente, o consumo de matéria seca foi estimado através da pesagem da quantidade oferecida, menos as sobras dos cochos.

Tabela 1. Ingredientes e composição da dieta oferecida aos ovinos.

INGREDIENTES	COMPOSIÇÃO (%MS)
<i>Feno de Coastcross</i>	10,0
Milho moído	70,4
Farelo de soja	16,0
Cloreto de amônio	0,5
Calcário	1,5
Mistura Mineral*	1,6
COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA	
Matéria Seca	90,4
Proteína Bruta	18,0
Extrato Etéreo	4,0

* **Composição:** 7,5% P, 13,4% Ca; 1% Mg; 7% S; 14,5% Na; 21,8% Cl; 500 ppm Fe; 300 ppm Cu; 4600 ppm Zn; 1100 ppm Mn; 55 ppm I; 40 ppm Co; 30 ppm Se.

Colheita de Amostras

Na última semana de adaptação foram realizadas colheitas de sangue nos intervalos: -0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 h em relação ao momento da oferta da dieta (0 hora), a fim de determinar a curva de insulina plasmática e por quanto tempo as concentrações circulantes permaneceram elevadas após a ingestão.

Após 4 e 8 semanas do início do fornecimento das dietas, no D0 foi realizada colheita de sangue de todos os animais para dosagem de P₄, a fim de confirmar que todas as fêmeas seriam pré-púberes. Assim não haveria liberação endógena de P₄ diferenciada entre os animais, ou seja, descartaria a possibilidade de presença de CL em algumas fêmeas no momento da avaliação das concentrações circulantes de P₄ provenientes de um dispositivo intravaginal.

Neste mesmo momento (D0), após a colheita de sangue e aplicação de PGF2 α (i.m., Lutalyse; Pfizer) os animais receberam um dispositivo intravaginal de liberação de P₄ (CIDR; 0,33g P₄; Pfizer), permanecendo com o dispositivo por 8 dias. No D6 foi realizada outra aplicação de PGF2 α , e no D8 foram realizadas colheitas de sangue nos seguintes intervalos: -0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 h em relação ao momento da oferta da dieta (0 hora), a

fim de determinar as curvas de insulina e P_4 plasmáticas (Figura 1). As amostras de sangue foram colhidas por venopunção da veia jugular, em tubos de vacutainer com anticoagulante (heparina sódica), e centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos. O plasma foi armazenado em criotubos Eppendorf, devidamente identificados a -20°C , para posteriores dosagens hormonais pela técnica de radioimunoensaio (RIA).

No D₉ foi realizada a biópsia hepática desses animais para posterior análise da expressão gênica das enzimas hepáticas pela técnica de PCR em tempo real.

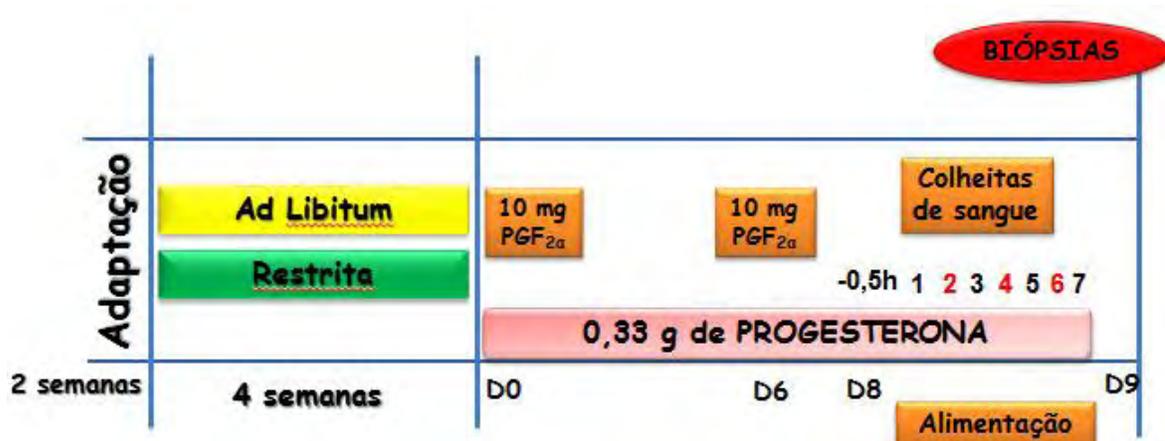


Figura 1. Esquema geral do período experimental.

Biópsias Hepáticas

As biópsias hepáticas foram realizadas no D₉, aproximadamente 4 h após o fornecimento da dieta seguindo o método de Lemley et al. (2010). Para a cirurgia foi realizada a tricotomia do flanco direito, seguida de assepsia com solução de iodo degermante. Estando o campo cirúrgico limpo e asséptico, foi realizada anestesia local com lidocaína, do tipo infiltrativa subcutânea, no 11^o espaço intercostal, a aproximadamente 12 cm ventral à coluna vertebral. Foi feita uma incisão de aproximadamente 1 cm na pele com o bisturi, e para coletar as amostras de fígado foi utilizada a agulha de biópsia 14 GA X 15 cm (TRU-CUT; Biocompany, Brasil). Após o procedimento cirúrgico o local da incisão foi tratado com Unguento Pearson (Eurofarma, Brasil) e com mata bicheira (Bactrovet Prata, Konig, Alemanha) e os animais foram tratados com penicilina (Pencivet® Plus, Shering, Brasil). As amostras de fígado foram preservadas em RNAlater® (Ambion, USA) dentro de criotubos Eppendorf, devidamente identificados e armazenados em freezer a -20°C até as análises laboratoriais.

Expressão RNAm

As análises de expressão gênica foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP.

As amostras de fígado foram homogeneizadas (Ika T10 basic Ultra Turrax®) e submetidas à extração total do RNA do tecido com o uso de reagente Trizol® (*Invitrogen*, Brasil), de acordo com o descrito no protocolo do fabricante, o qual corresponde a uma adaptação da metodologia descrita por Chomczynski e Sacchi (1987).

Após a extração, a quantificação individual do RNA extraído de cada uma das amostras foi realizada pelo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA). As amostras de RNA total foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% para comprovação de sua integridade.

A síntese de cDNA foi realizada segundo protocolo do *Kit SuperScript® III Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Os cDNAs foram sintetizados à partir de 1µg de RNA total das amostras de tecido.

Os pares de primers específicos para cada um dos genes estudados foram selecionados baseado na sequência dos mesmos depositadas no GenBank para a espécie ovina e adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda e Life Technologies Brasil (São Paulo, SP). Importantes considerações para a realização da técnica de RT-qPCR, descritas por Udvardi et al. (2008) e por Bustin et al. (2009), também foram adotadas. Todos os primers foram otimizados para amplificarem a 58°C. Para o controle interno foram utilizados cinco genes de referência: β -actina; ciclofilina A (*PPIA*); proteína ribossomal L19 (*RPL19*); gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*); e, *ATPase*, sendo estes selecionados de acordo com a estabilidade através do software *geNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002) para serem utilizados nas análises estatísticas como genes de referência. A especificidade dos produtos de RT-qPCR também foi confirmada através da eletroforese de gel de agarose. Além disso, foi realizada a análise da curva de melting para a verificação da temperatura de desnaturação do produto amplificado, conforme descrito por Zaros et al. (2007).

As análises de PCR em tempo real foram realizadas através do sistema de detecção *Lightcycler® 480* (Roche) utilizando o kit *Lightcycler® 480 SYBR Green I Master* (Roche).

As condições das reações foram: 0,4 μ M de cada primer, 5 μ L do SYBR Green Mix 2X e 1 μ L de cDNA diluído oito vezes à partir do estoque; o volume final foi ajustado para 10 μ L. Os ciclos da PCR foram feitos da seguinte maneira: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação que compreenderam etapa inicial a 95°C (5 segundos), anelamento por 30 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos. A seguir foi a curva de melting dos produtos: a partir de 65°C, as amostras foram gradativamente aquecidas até 95°C, com aquisição contínua do sinal de fluorescência pelo equipamento.

A eficiência individual de cada amostra foi calculada utilizando-se o programa LingRegPCR (RAMAKERS et al., 2003), utilizando no mínimo quatro pontos da curva de amplificação durante a fase exponencial. Os dados de fluorescência obtidos no equipamento PCR em tempo real foram exportados para o programa *LingRegPCR*, o qual utiliza uma análise de regressão linear dos dados de fluorescência da fase exponencial da PCR para determinar a quantidade de RNAm e a eficiência de amplificação. Através do *LingRegPCR* os valores de Ct foram determinados para cada amostra. À partir da eficiência individual das amostras obtidas pelo software, foi adotado um procedimento de correção dos valores de Ct para a eficiência ideal de amplificação (2.0).

Resultados

O grupo que recebeu dieta *ad libitum* teve consumo alimentar e uma média de ganho de peso superior ($P < 0001$) ao do grupo que recebeu dieta restrita (Tabela 2).

Tabela 2. Média dos quadrados mínimos \pm EP do consumo diário alimentar (kg/animal/d) e ganho médio semanal de peso corporal (kg) para o grupo de dieta *ad libitum* e dieta restrita respectivamente, durante todo o período experimental.

	<i>Ad libitum</i> (n=24)	Restrita (n=24)	P
Peso Corporal (kg)	1,28 \pm 0,09	-0,002 \pm 0,09	0,0001
Consumo (kg/animal/dia)	1,80 \pm 0,03	0,56 \pm 0,004	0,0001

Durante o período de adaptação, antes de iniciar as dietas experimentais, o pico plasmático pós-prandial de insulina ocorreu 1 h após a ingestão alimentar, atingindo 13,86 \pm 2,33 μ UI/mL (Figura 2).

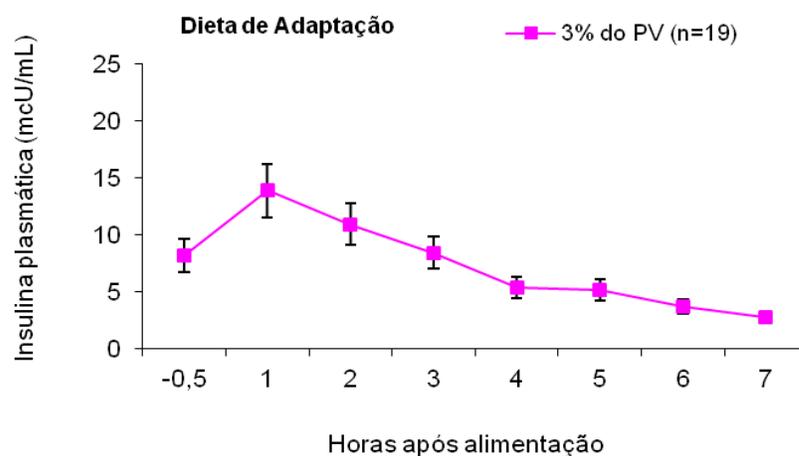


Figura 2. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações séricas de insulina (μ UI/mL) durante o período de adaptação (15 dias; 3% de matéria seca por kg de peso corporal).

As concentrações plasmáticas de insulina durante todo o período experimental foram maiores para o grupo que recebeu dieta *ad libitum* em relação ao grupo que recebeu dieta restrita (Tabela 3).

Tabela 3. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações circulantes de insulina (μ UI/mL) coletadas antes (-0,5h) e após ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas que receberam dieta *ad libitum* (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal), durante todo o período experimental (4 e 8 semanas).

	<i>Ad libitum</i> (n = 10)	Restrita (n = 11)	P
4 semanas	8,15 \pm 0,93	1,46 \pm 0,16	0,0001
8 semanas	11,95 \pm 1,02	2,19 \pm 0,18	0,0001

Ao final da quarta semana experimental não foi detectada interação entre tratamento e hora ($P = 0,30$), para concentrações plasmáticas de insulina, independentemente do tratamento nutricional (Figura 3). Apesar de não ter sido encontrada interação entre tratamento e hora, observou-se um aumento entre 2 e 5 horas após ingestão alimentar no grupo de dieta *ad libitum*.

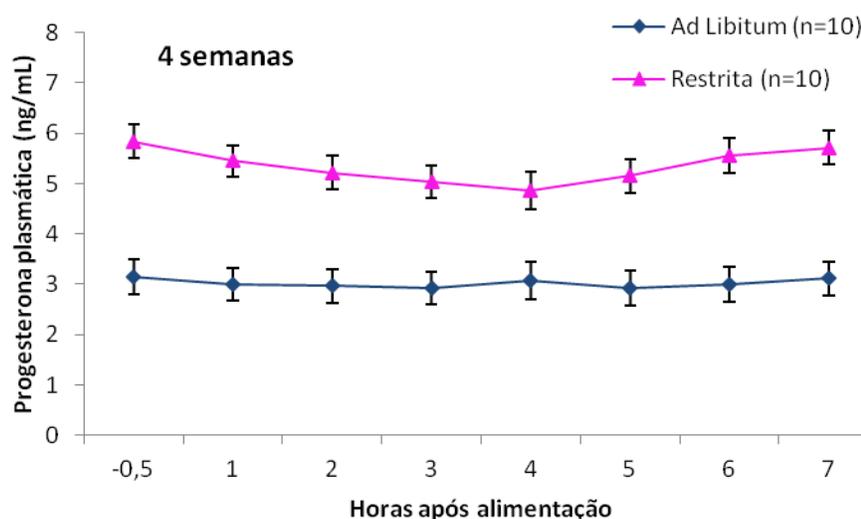


Figura 3. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações plasmáticas de insulina (μ UI/mL) realizadas antes (-0,5 h) e após a ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas submetidas à dieta *ad libitum* (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e

dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal) ao final das primeiras 4 semanas experimentais.

Entretanto, ao final da oitava semana, observou-se uma interação entre tratamento e hora ($P = 0,019$) no grupo de dieta restrita entre 5 e 6 horas ($P = 0,015$; Figura 4).

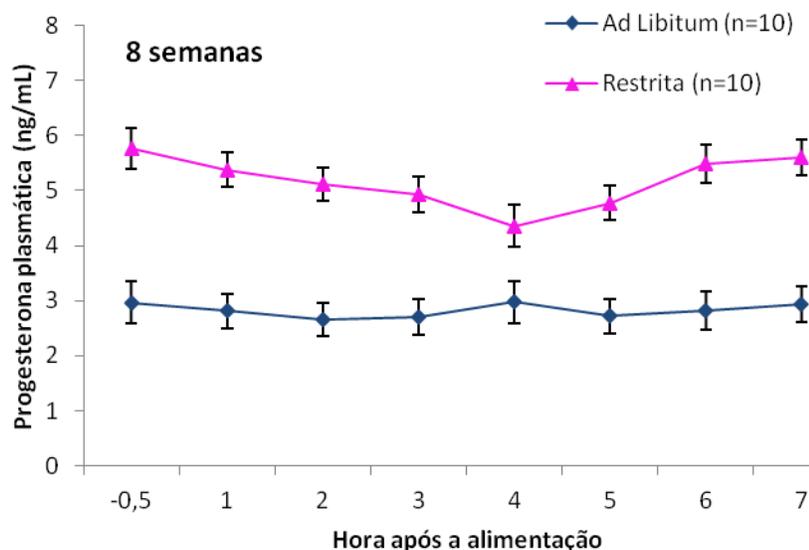


Figura 4. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações plasmáticas de progesterona ($\mu\text{UI/mL}$) realizadas antes (- 0,5h) e após a ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas submetidas à dieta *ad libitum* (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal) ao final do experimento (8 semanas).

Concentrações plasmáticas de P_4 durante todo o período experimental foram menores para o grupo que recebeu dieta *ad libitum* quando comparado ao grupo de dieta restrita (Tabela 4).

Tabela 4. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações plasmáticas de P4 (ng/mL) coletadas antes (-0,5h) e após ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas submetidas à dieta *ad libitum* (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal), durante todo o período experimental (4 e 8 semanas).

	<i>Ad libitum</i> (n = 10)	Restrita (n = 10)	P
4 semanas	3,21 \pm 0,32	5,53 \pm 0,32	0,0001
8 semanas	2,82 \pm 0,28	5,17 \pm 0,28	0,0001

Não houve interação entre tratamento e hora ao final da quarta semana ($P = 0,11$), nem ao final da oitava semana ($P = 0,31$; Figuras 5 e 6).

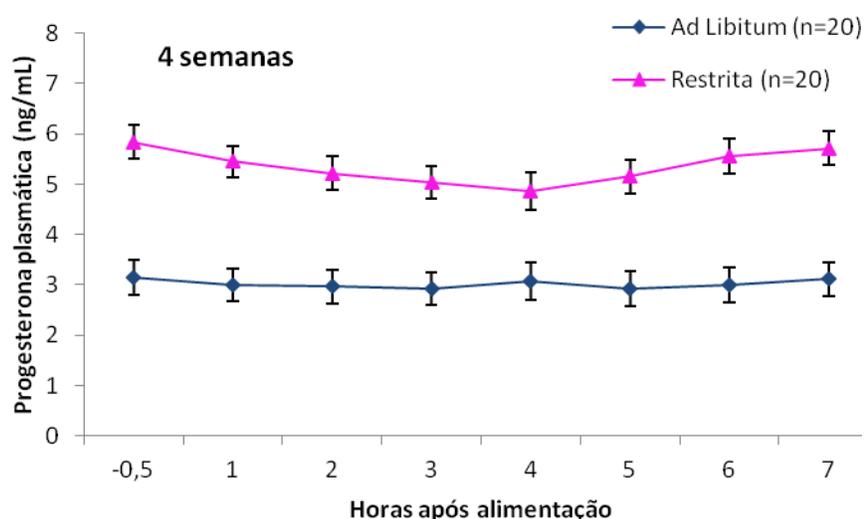


Figura 5. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) realizadas antes (-0,5 h) e após a ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas submetidas à dieta *ad libitum* (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal) ao final das primeiras 4 semanas experimentais.

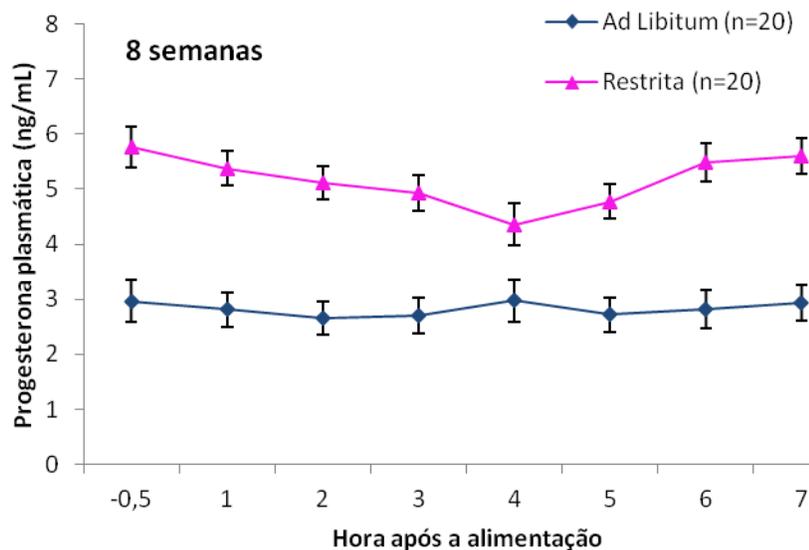


Figura 6. Média dos quadrados mínimos \pm EP das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) realizadas antes (-0,5 h) e após a ingestão alimentar (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h) em ovelhas submetidas à dieta *ad libitum* (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal) ao final do experimento (8 semanas).

Para a expressão de RNAm de CYP2C e CYP3A, não houve efeito de tratamento dietético após a ingestão alimentar ao final da quarta semana ($P = 0,98$; Tabela 5). Entretanto, ao final da oitava semana, foi observado que a CYP2C foi 1.8 vezes mais expressa no grupo que recebeu dieta *ad libitum* quando comparada ao grupo que recebeu dieta restrita ($P = 0,06$), mas o mesmo não foi observado para a CYP3A (Tabela 5).

Tabela 5. Expressão relativa de RNAm de CYP2C e CYP3A às 4 h após o fornecimento de dieta *ad libitum* (3,8% de matéria seca por kg de peso corporal) e dieta restrita (2% de matéria seca por kg de peso corporal) ao final da quarta e oitava semana experimental¹

Enzimas	4 semanas (n=21)			8 semanas (n=21)		
	<i>Ad libitum</i>	Restrita	<i>P</i>	<i>Ad libitum</i>	Restrita	<i>P</i>
CYP2C	18,60 ± 0,66	18,62 ± 0,64	0,98	17,59 ± 0,33	18,45 ± 0,32	0,06
CYP3A	16,47 ± 0,50	16,25 ± 0,49	0,74	15,69 ± 0,29	16,11 ± 0,28	0,29

¹Biópsias de fígado, para investigação da expressão do RNAm, foram feitas às 4h após o fornecimento da dieta.

²Valores estão expressos em *Threshold Cycle* (CT): é o número de ciclos necessários para o início da amplificação da sequência gênica-alvo presente no DNA de cada amostra; ou seja, durante a amplificação é construído um gráfico no lightcycler relacionando em tempo real os ciclos de termociclagem com a intensidade de fluorescência emitida durante a amplificação do DNA nas amostras, ciclo a ciclo. Equação utilizada para correção dos valores: $\text{Log}(e^{ct}; 2)$.

Discussão

Concentrações plasmáticas de insulina durante todo o período experimental foram maiores no Grupo *Ad libitum* do que no Restrito, o que era esperado devido a alta IMS nesse grupo, pois sabe-se que a insulina atua como um sinal do estado energético para o sistema nervoso central, ou seja, as concentrações séricas de insulina estão associadas a ingestão de nutrientes (BUTLER et al., 2004; SCHWARTZ et al., 2000).

Alguns trabalhos demonstraram que dietas insulinêmicas, que disponibilizam maiores quantidades de acetato e propionato no rúmen, induzem o aumento das concentrações plasmáticas de insulina (BERGMAN et al., 1990). Sabe-se que o propionato é um importante precursor para a gliconeogênese no fígado, aumentando assim a disponibilidade de energia, resultando em um melhor desempenho reprodutivo em vacas

leiteiras (GONG et al., 2002; BUTLER et al., 2004), estimulando a liberação de GNRH e a esteroidogênese (ARIAS et al., 1992; BEAM & BUTLER 1999).

Carboidratos são importantes fontes de energia. Em ruminantes são convertidos em ácidos graxos de cadeia curta, como resultado da fermentação microbiana, estimulando assim a secreção de insulina pelo pâncreas (DE JONG et al., 1982). Corroborando nosso trabalho, diversos estudos mostraram o efeito da alta IMS ou dietas isoenergéticas nas concentrações circulantes de insulina (BUTLER et al., 2004; LEMLEY et al., 2008; MORIEL et al., 2008).

Durante o período de adaptação, em que as ovelhas recebiam dieta de manutenção (3% do PC), o pico pós-prandial insulinêmico ocorreu 1 h após ingestão alimentar. Entretanto o mesmo não foi observado ao final da quarta e oitava semana para o grupo Ad e R, pois ovelhas do grupo *Ad libitum* recebiam dieta a vontade, ou seja, não houve controle total do momento da ingestão. Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa entre as horas em cada grupo (interação) observou-se um aumento nas concentrações plasmáticas de insulina entre 2 e 5 h após o fornecimento da dieta, semelhantes a estudos anteriores em que vacas tratadas com glicose tiveram maiores concentrações plasmáticas de insulina às 3 h pós-infusão do que em vacas que receberam salina (VIEIRA, 2012). Em vacas não lactantes (girolando), também foi observado um aumento a partir de 2 h após a ingestão alimentar (MORIEL et al., 2008).

De acordo com Parr et al. (1993) existe uma relação inversa entre o nível de ingestão alimentar e concentrações plasmáticas de P_4 em ovelhas. No presente estudo, ovelhas que receberam dieta Ad apresentaram maiores concentrações circulantes de insulina, entretanto neste mesmo grupo foram observadas muito menores concentrações circulantes de P_4 , justificado pelo elevado metabolismo de P_4 em consequência de um maior fluxo sanguíneo hepático (PARR et al. 1987; SANGSRITAVONG et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003).

Smith et al. (2006) mostraram que o propionato é mais eficiente que o acetato, em aumentar os níveis circulantes de insulina e também em reduzir a metabolização da P_4 . Dessa forma, pode-se sugerir que a composição e não só o volume da dieta fornecida pode atenuar a metabolização da P_4 e manter suas concentrações circulantes mais elevadas, uma vez que é sabido que dietas ricas em carboidratos não fibrosos são mais eficientes em

disponibilizar propionato aos ruminantes (BERGMAN et al., 1990). Entretanto, de acordo com Niswender (2000), grande parte da P₄ circulante é inativada ou catabolizada no fígado, portanto qualquer aumento na taxa de fluxo de sangue para o fígado irá produzir um aumento na taxa de metabolismo de P₄, o que pode explicar parte dos resultados obtidos até aqui.

A P₄ circulante é inativada ou catabolizada nos hepatócitos pelas enzimas citocromo P450 2C (CYP2C) e citocromo P450 3A (CYP3A), e os principais metabólitos são a 21-hidroxiprogesterona e a 6 β -hidroxiprogesterona, respectivamente (MURRAY, 1991, 1992). Além das CYPs há outra via de catabolismo através das Aldo AKRs, principalmente a AKR1C e AKR1D. As AKRs são enzimas importantes que atuam junto com as CYPs na primeira fase da biotransformação dos esteróides. Alguns trabalhos sugerem que a insulina parece ser um inibidor da expressão do gene e proteína para as enzimas CYP2C, CYP3A, AKR1C e AKR1D em fígado de bovino e ovino (LEMLEY et al., 2008; LEMLEY et al., 2010), entretanto neste estudo estes efeitos não foram observados. Expressão de RNAm de CYP2C e CYP3A não foi afetada após a ingestão alimentar, ao final da quarta semana para ovelhas do grupo *Ad libitum* e restrito. Entretanto, contrariando alguns trabalhos, ao final da oitava semana, embora não tenha sido observada alteração na expressão gênica para a CYP3A, a CYP2C foi 1.8 vezes mais expressa no grupo Ad quando comparada ao grupo R, o que foi inesperado, pois este grupo apresentou maiores concentrações circulantes de insulina. Corroborando o presente estudo, Vieira (2012) também observou um aumento na expressão da CYP3A no grupo que recebeu infusão de glicose, ou seja, o grupo que apresentava maiores concentrações sanguíneas de insulina.

Por outro lado, a maioria dos trabalhos baseou-se em cultivo de hepatócitos *in vitro* ou na infusão de insulina, propilenoglicol ou propionato (SMITH et al., 2006; LEMLEY et al., 2007; LEMLEY et al., 2008). No estudo de Lemley et al. (2008), foi observado que mesmo com o aumento de 30% de insulina para vacas que recebiam propilenoglicol, expressão de RNAm de CYP2C em vacas recebendo água ou propilenoglicol não diferiu entre os tratamentos, entretanto houve diminuição de 40% na quantidade de RNAm de CYP3A. Neste mesmo trabalho, conforme insulina era infundida i.v. (1,0 g de insulina/kg de PV/h), houve diminuição na expressão de ambas as enzimas CYP2C (88%) e CYP3A (45%), respectivamente. No entanto, em outro estudo realizado por Lemley et al. (2010a),

curiosamente apesar das concentrações plasmáticas de insulina não terem sido diferentes entre as dietas experimentais (alto grão X alta fibra) no momento da biópsia hepática (3,7 h pós-alimentação), foi observado um aumento de 22% nas concentrações de insulina no grupo que recebeu alto grão durante o período de coleta de sangue (10 h). Entretanto, neste estudo a expressão das enzimas CYP2C e CYP3A não diferiu entre as duas dietas experimentais.

Desta forma, ainda não está totalmente definido se o aumento nas concentrações de insulina *in vivo* causado pela maior ingestão de matéria seca e/ou energia é suficiente para reduzir a expressão das enzimas hepáticas CYP2C e CYP3A, AKR1C e AKR1D reduzindo assim o metabolismo da P₄.

Conclusões

Após a realização deste estudo foi possível concluir que, de fato, a dramática redução na P₄ circulante após a alimentação *ad libitum* em relação às ovelhas com restrição alimentar, ocorreu, muito provavelmente, devido ao elevado metabolismo de P₄ em consequência de um maior fluxo sanguíneo hepático causado pela maior ingestão alimentar.

Entretanto, apesar de alguns estudos sugerirem que a insulina tem um efeito inibitório na expressão das enzimas hepáticas responsáveis pelo metabolismo da P₄, reduzindo assim o metabolismo deste hormônio e aumentando suas concentrações circulantes, neste estudo foi observado um efeito nulo, ou até mesmo contrário, para expressão de algumas enzimas hepáticas.

Referências

ARIAS, P.; RODRIGUEZ, M.; SZWARCFARB, B.; SINAY, I.R.; MOGUILVSKY, J.A. Effect of insulin on LHRH release by perfused hypothalamic fragments. **Neuroendocrinology**, v.56, p. 415-418, 1992.

BEAM, S.W.; BUTLER, W.R. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.54, p. 411-424.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGERTT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFI, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEW, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, **Clinical Chemistry**, 55, 611-22, 2009.

BUTLER, W. R. Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. **Animal Science**, v.26, p.133-145, 2001.

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.

De JONG, A. Patterns of plasma concentrations of insulin and glucagon after intravascular and intraruminal administration of volatile fatty acids in the goat. **J. Endocrinol**, v. 92, p. 357–370, 1992.

GONG J.G.; LEE W.J.; GARNSWORTHY P.C.; WEBB R. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early post-partum period on reproductive function in dairy cows. **Reproduction**, v.123, p.419-27, 2002.

JIN, Yi.; MESAROS, C.; BLAIR, I.A. and PENNING, T.M. Stereospecific reduction of 5 β -reduced steroids by human ketosteroid reductases of the AKR (aldo-keto reductase) superfamily: role of AKR1C1–AKR1C4 in the metabolism of testosterone and progesterone via the 5 β -reductase pathway. **Biochemical Journal**, v. 437, p.53-61, 2011.

LEMLEY, C.O. 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 10/09/2011.

LEMLEY, C. O.; BUTLER, S. T.; BUTLER, W. R. and WILSON, M. E. 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, 2008.

LEMLEY, C. O.; VONNAHME, K. A.; TAGER, L. R.; KRAUSE, K. M. AND WILSON, M. E. Diet-induced alterations in hepatic progesterone (P4) catabolic enzyme activity and P4 clearance rate in lactating dairy cows. **Journal of Endocrinology**, 2010.

MORIEL, P.; SCATENA, T. S.; SÁ FILHO, O. G.; COOKE, R. F. and VASCONCELOS, J. L. M. 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. **J. Steroid Biochem. 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. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** v.43, p.591–593, 1992.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYSON, K.M.; MCINTUSH, E.W. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. **Physiological Reviews.** v. 80, n° 1, 2000.

PARR, R. A.; CUMMING, I. A.; CLARKE, I. J. Effects of maternal nutrition and plasma progesterone concentrations on survival and growth of the sheep embryo in early gestation. **J. Agric. Sci.** v.98, p.39-46, 1982.

PARR, R.A.; DAVIS, I.F.; MILES, M.A.; SQUIRES, T.J. Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. **Research in Veterinary Science**, v.55, p. 306-310, 1993.

PENNING, T. M., BURCZYNSKI, M. E., JEZ, J. M., HUNG, C., LIN, H., MA, H., MOORE, M., PALACKAL, N. and RATNAM, K. 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. **Journal Biochemistry**, v.351, p.67-77, 2000.

SCHWARTZ, M.W.; WOODS, S. C.; PORTE, D. Jr.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, p. 661-671, 2000.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D.K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L.E.; WILTBANK, M.C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17B in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2831-42, 2002.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p.905-920, 2004.

SMITH, D. L.; STINEFELT, B. M.; BLEMININGS, K. P. and WILSON, M. E. Diet-induced alterations in progesterone clearance appear to be mediated by insulin signaling in hepatocytes. **Journal Animal Science**, v.84, p.1102–1109, 2006.

UDVARDI, M.K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W.R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. **The Plant Cell**, 20, 2008.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; and SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** 3: Research0034, 2002.

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

VIEIRA, F.V.R. Infusão intravenosa de glicose e balanço energético na expressão de enzimas hepáticas responsáveis pelo catabolismo de progesterona em bovinos. Tese de Mestrado. Unesp, Botucatu, 2012.

ZAROS, L.G., BRICARELLO, P.A., AMARANTE, A. F. T., COUTINHO, L. L. Quantification of bovine cytokine gene expression using real-time rt-pcr methodology. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p. 575-579, 2007.

WEBB, R; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v.82 (Supl), p.E63-E74, 2004.