

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

**Efeito da administração de somatotropinapré-parto em novilhas da raça
Holandês com elevada condição corporal sobre parâmetros
metabólicos, reprodutivos e produção leiteira**

DIEGO ANDRES VELASCO ACOSTA

Pelotas, 2012

Diego Andres Velasco Acosta

**Efeito da administração de somatotropinapré-parto em novilhas da raça
Holandês com elevada condição corporal sobre parâmetros
metabólicos, reprodutivos e produção leiteira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Nutrição de Ruminantes).

Orientador: Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino,
Co-orientador: Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

A185e Acosta, Diego Andres Velasco

Efeito da administração de somatotropina pré-parto em novilhas da raça Holandês com elevada condição corporal sobre parâmetros metabólicos, reprodutivos e produção leiteira / Diego Andres Velasco Acosta; orientador Francisco Augusto Burkert Del Pino ; co-orientador Marcio Nunes Corrêa - Pelotas,2012.----f. ; il.- Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1.Novilhas 2.rBST 3.AGNE 4.BHBA I.Del Pino, Francisco Augusto Burkert(orientador) II .Título.

CDD 636.20824

Banca Examinadora:

Maurício Machaim Franco, Dr., EMBRAPA Brasília

Eduardo Schmitt, Dr., Universidade Federal de Pelotas

Cassio CassalBrauner, Dr., Universidade Federal de Pelotas

Francisco Augusto Burkert Del Pino, Dr., Universidade Federal de Pelotas
(Presidente)

Agradecimentos

A minha família, Ana Acosta, Pedro e Diana Velasco, pelo apoio, suporte, carinho e compreensão.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia pela oportunidade de realizar o mestrado.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos oferecida durante o curso.

Ao meu Orientador Francisco Augusto Burkert Del Pino por ter me aceitado como seu orientado e pela sua colaboração durante todo o mestrado.

Ao meu Co-orientador Marcio Nunes Corrêa pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos e, especialmente, pela paciência durante meu mestrado.

Ao doutores Luiz Francisco Machado Pfeifer, Eduardo Schmitt e Augusto Schneider pela disponibilidade e auxílio na discussão de ideias e resultados.

Aos integrantes do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC) pelo auxílio na discussão e execução do projeto.

A Carolina por ser a pessoa maravilhosa que é comigo, e principalmente, por ficar de meu lado nos momentos mais difíceis no mestrado.

Ao meu amigo Pedro Silveira pelo apoio na execução do projeto e pela amizade.

Resumo

ACOSTA. Diego Andres Velasco. **Efeito da administração de somatotropina pré-parto em novilhas da raça Holandês com elevada condição corporal sobre parâmetros metabólicos, reprodutivos e produção leiteira.**

2012. 44 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O balanço energético negativo (BEN) tem sido associado com alterações nos hormônios que auxiliam o desenvolvimento folicular no início da lactação. A aplicação pré-parto de somatotropina recombinante bovina (rbST) pode levar a uma redução sérica dos ácidos graxos não esterificados (AGNE) e β -hidroxibutirato (BHBA) no período pós-parto. Portanto, a administração pré-parto de somatotropina pode resultar em alterações metabólicas que beneficiam o equilíbrio energético da vaca leiteira após o parto. O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da administração pré-parto de somatotropina em novilhas leiteiras com elevado escore de condição corporal (ECC) sobre marcadores BEN, a retomada da atividade ovariana e produção de leite. Foram utilizadas novilhas da raça Holandês ($n = 20$) com ECC elevada (Escala 1-5; $ECC > 3,5$), foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo somatotropina ($n = 10$) que recebeu duas aplicações de 500 mg de rbST nos dias -28 e -14 referente ao parto e grupo controle ($n = 10$) que recebeu aplicações de placebo no mesmo local e forma do grupo somatotropina. Amostras de sangue foram coletadas entre os dias -28 a 42 relativos ao parto para a avaliação das concentrações de BHBA e AGNE. O desenvolvimento folicular também foi monitorado através de exames de ultrassom a partir do dia 10 pós-parto, e cada 3 dias até o momento da primeira ovulação. A administração pré-parto de somatotropina não afetou ($P = 0,28$) o momento da primeira ovulação pós-parto. A proporção de vacas que ovularam na primeira onda folicular pós-parto não foi diferente entre os grupos ($P = 0,49$). Não houve efeito ($P > 0,05$) do tratamento pré-parto de somatotropina sobre o diâmetro do folículo dominante da primeira onda folicular pós-parto. Houve interação entre o dia e grupo para as concentrações plasmáticas de AGNE durante o período pré-parto ($P = 0,03$) e uma tendência para o dia ($P = 0,07$), mas nenhum efeito sobre o grupo ($P = 0,35$). Houve apenas um efeito da semana ($P < 0,001$) para as concentrações de AGNE no pós-parto. As concentrações de AGNE pós-parto foram maiores nos dias 0, 7 e 14 do que em 21, 28, 35 e 42 ($P < 0,05$). Para BHBA pré e pós-parto não houve efeito de dias ($P > 0,05$), grupo ($P > 0,05$) ou dias por grupo ($P > 0,05$). Em conclusão, o tratamento pré-parto de somatotropina em novilhas leiteiras com condição corporal elevada não melhorou os parâmetros que indicam que estas novilhas tiveram um BEN menos grave durante o período pós-parto, não teve efeito sobre o desenvolvimento da primeira onda folicular pós-parto e produção leiteira.

Palavras chave: rbST, novilhas, AGNE, BHBA.

Abstract

ACOSTA, Diego Andres Velasco. **Effect of prepartum somatotropin injection in late pregnant Holstein heifers with high body condition score on metabolic, reproductive parameters and milk production.**

2012. 44 f. Dissertation (Master). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Negative energy balance (NEB) has been associated with changes in hormones that support follicular development in early lactation. Prepartum recombinant bovine somatotropin (rbST) injection led to reduced non-esterified fatty acids (NEFA) and β -hydroxybutyrate (BHBA) in the early postpartum period. Therefore, prepartum administration of somatotropin may result in metabolic changes that benefit the energetic balance of the postpartum dairy cows. The aim of this study was to determine the effect of prepartum injections of somatotropin in dairy heifers with high BCS on the markers of NEB, resumption of ovarian activity and milk production. Holstein heifers (n=20) with high body condition score (scale 1-5; BCS>3.5) were randomly divided into two groups: somatotropin group (n=10) that received two doses of 500 mg of rbST at -28 and -14 days from calving; and control group (n=10) that received applications of placebo in a similar manner to somatotropin group. Blood samples were collected weekly from -28 to 42 d after calving to evaluate BHBA and NEFA concentrations. Follicular development was also monitored via ultrasound examinations starting at days 10 postpartum and every 3 days until ovulation. Prepartum somatotropin administration did not affect ($P=0.28$) the moment of the first postpartum ovulation. The proportion of cows ovulating the first follicular wave postpartum was not different between groups ($P=0.49$). There was no effect ($P>0.05$) of prepartum treatment on the diameter of the first postpartum dominant follicle. There was an interaction days by group for plasma NEFA concentrations during the prepartum period ($P=0.03$) and a tendency for the day ($P=0.07$) but no effect on the group ($P=0.35$). There was only an effect of the week ($P<0.001$) for postpartum NEFA concentrations. Postpartum NEFA concentration was higher at days 0, 7 and 14 than at 21, 28, 35 and 42 ($P<0.05$). For pre and postpartum BHBA there was no effect of days ($P>0.05$), group ($P>0.05$) or days by group ($P=0.05$). In conclusion, prepartum somatotropin treatment in dairy heifers with high body condition did not improve parameters that indicate that these heifers had a less severe NEB during the early *postpartum* period, had not affect development of the first follicular wave in the postpartum period and milk production.

Key words: rbST, heifers, NEFA, BHBA.

Sumário

1. Introdução Geral.....	8
2. Projeto Pesquisa	11
2.1 Identificações da proposta.....	12
2.2 Qualificações do principal problema a ser abordado.....	12
2.3 Objetivos e metas a serem alcançados.....	13
2.3.1 Objetivo geral	13
2.3.2 Objetivos específicos	14
2.4 Metodologia e Estratégia de ação	14
2.5 Principais contribuições científicas e tecnológicas da proposta.....	16
2.5.1 Científicas	16
2.5.1 Tecnológicas.....	16
2.6 Cronograma físico-financeiro	17
2.7 Identificação dos demais participantes do projeto.....	17
2.8 Disponibilidade efetiva de infraestrutura e de apoio técnico	20
2.9 Estimativa dos recursos financeiros de outras fontes.....	20
2.10 Referências Bibliográficas	21
3. Relatório de Trabalho de Campo	24
3.1 Período do experimento	24
3.2. Fazenda experimental.....	24
3.3. Animais.....	25
3.5. Protocolo de Ultrassonografia	25
4. Artigo	26
5. Conclusão geral	40
6. Referências bibliográficas	41

1. Introdução Geral

O período de transição em vacas leiteiras é definido como três semanas antes até duas semanas após o parto (GRUMMER, 1995). Sendo esta fase o momento mais estressante no ciclo de produção de uma vaca leiteira, devido ao consumo de ração diminuído e alterações endócrinas e metabólicas ao parto (GUO et al., 2007). O período de transição requer uma coordenação complexa de tecidos para apoiar o início da lactação (BAUMAN & CURRIE, 1980).

O Aumento das concentrações plasmática de ácidos graxos não esterificados (AGNE) é uma característica comum em vacas leiteiras durante o período de transição, e reflete a crescente dependência da mobilização de reservas de tecido adiposo para suportar as demandas de energia para a síntese do leite (PIRESE et al., 2007). Estas demandas energéticas aumentam muito e ultrapassam a capacidade de ingestão fazendo com que a vaca entre em balanço energético negativo (BEN) (BAUMAN & CURRIE, 1980). Alguns dos fatores que influenciam o BEN são a condição corporal pré-parto, a dieta que o animal recebeu antes do parto, a dieta fornecida pós-parto, e a produção leiteira (BROWN et al., 2011). Embora os mecanismos ainda não estejam bem entendidos, é amplamente aceito que o escore de condição corporal (ECC) está negativamente associado com a ingestão de matéria seca (IMS) (ROCHE et al., 2008). Devido a isso, a perda de ECC no pós-parto e intensidade do balanço energético negativo aumentam com o aumento do ECC ao parto (ROCHE et al., 2007). Além do mais, TREACHER et al. (1986), relataram que vacas moderadamente condicionadas ao parto produziram mais leite do que vacas gordas (2,8 vs 3,9; escala de 5 pontos). A queda na ingestão de nutrientes também está associada a mudanças no estado metabólico e hormonal (DRACKLEY & DANN, 2005), resultando numa maior mobilização de lipídios do tecido adiposo, aumento da cetogênese e diminuição da disponibilidade de glicose, aminoácidos e ácidos graxos voláteis (GULAY et al., 2007).

Além do controle do ECC, outras estratégias têm sido usadas para diminuir a intensidade do BEN (OVERTON & WALDRON, 2004). Limitar o consumo de energia pré-parto tem sido uma estratégia utilizada para diminuir o desenvolvimento de

cetose, fígado gorduroso ou outros problemas de saúde no período de transição (BEEVER, 2006). A alimentação com linhaça no pré-parto pode ser uma estratégia útil para aumentar as concentrações de glicogênio no fígado e para diminuir as concentrações de triglicerídeos do fígado após o parto, o que pode impedir o desenvolvimento de fígado gorduroso em vacas leiteiras no período transição (PETIT et al., 2007).

Neste sentido a suplementação de vacas com baixas doses de somatotropina durante o período peri-parto tem sido associado com possíveis efeitos benéficos sobre as adaptações fisiológicas e função hepática (GULAY et al. 2003, GULAY et al., 2004). Os mecanismos biológicos classificados como metabólicos referem-se à sua ação direta sobre vários tecidos e, em especial sobre o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (NETO *et al.*, 2009). A somatotropina recombinante bovina (rbST) é um agente homeorrético utilizado no período pós-parto para aumentar a produção de leite (BAUMAN et al., 1985). No entanto, o tratamento com rbST no período pré-parto também induz aumento na produção de leite segundo alguns estudos (STELWAGEN et al., 1992; PUTNAM et al., 1999; SCHNEIDER et al., 2011). PUTNAM et al. (1999) mostrou que a aplicação pré-parto da somatotropina aumentou IMS e resultou em aumento das concentrações de glicose e redução nas concentrações de AGNE e β -hidroxibutirato (BHBA) no período pós-parto. Em um estudo de BAUMAN (1992) o uso de somatotropina ocasionou redução na oxidação da glicose nos tecidos periféricos e aumento da gliconeogênese hepática. A somatotropina tem efeitos diretos na partição de nutrientes para os tecido alvo (BAUMAN & VERNON 1993), assim como efeitos indiretos, expressos na glândula mamária e outros tecidos que são mediados pelo fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-I) (JONES & CLEMMONS 1995). A aplicação de somatotropina no periparto é capaz de aumentar os níveis circulantes de IGF-I e a produção de leite (PUTNAM et al. 1999; GULAY et al 2004; CARRIQUIRY et al., 2009; SCHENEIDER et al., 2011). Em vacas leiteiras sob balanço energético positivo, tratamentos com somatotropina induziram efeitos galactopoiéticos e lipolíticos (SHINGU et al., 2008). Em geral, a resposta do leite ao tratamento com somatotropina depende do balanço energético (BE) das vacas em lactação (BAUMAN, 1992). Estas evidências indicam que a injeção pré-parto de somatotropina é uma ferramenta para melhorar o período de transição da vaca

leiteira.

Com relação a reprodução, sabe-se que a aplicação de somatotropina aumenta o número de folículos recrutados por até 21 dias após o fim das aplicações (KIRBY et al., 1996). A duração e a intensidade do BEN está negativamente associada ao desempenho reprodutivo. Assim, vacas em BEN tem um atraso no retorno a atividade ovariana pós-parto e conseqüentemente um atraso no momento da concepção (BUTLER & SMITH, 1989). Para estes animais, quanto mais ciclos estrais antes do momento da primeira inseminação, maior será a taxa de prenhez (THATCHER & WILCOX, 1973). Portanto, o uso de estratégias que antecipem o momento da primeira ovulação irão beneficiar também o momento da concepção.

Logo após o parto, devido ao intenso BEN, vacas leiteiras têm uma redução drástica no nível sanguíneo de insulina, devido à drenagem de glicose pela glândula mamária para a síntese de lactose (BUTLER et al., 2003). Esta redução no nível de insulina leva a uma redução na expressão hepática do receptor do Hormônio de crescimento (GHR), especialmente GHR 1A (BUTLER et al., 2003), que compreende 50% do GHR hepático (JIANG & LUCY, 2001). Como o IGF-I é produzido em resposta a ativação do GHR pelo GH (JONES & CLEMMONS, 1995), nesta situação há uma dissociação do eixo GH/IGF-I, pois com a redução do GHR há uma redução na expressão hepática e nível circulante de IGF-I (FENWICK et al., 2008). A circulação de IGF-I desempenha um papel essencial na reprodução (VELAZQUEZ et al., 2008). As concentrações de IGF-I em sangue estão relacionadas com o retorno da atividade ovariana pós-parto (BUTLER et al., 2006) e sobrevivência de embrionária (VELAZQUEZ et al., 2005). Além disso, o IGF-I atua sobre o crescimento e diferenciação de folículos (RIVERA & FORTUNE, 2003)

2. Projeto Pesquisa

**CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
Modelo Estruturado**

**Efeito da aplicação de somatotropina no período pré-parto de novilhas leiteiras
com elevada condição corporal sobre parâmetros metabólicos,
restabelecimento da ovulação e produção de leite**

*Projeto Aprovado pelo comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade
Federal de Pelotas (Registro n° 10126 Cadastro no COCEPE - 5.04.00.058*

**Professor Francisco Augusto Buerket Del Pino
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

Pelotas, 2011

2.1 Identificações da proposta

Efeito da aplicação de somatotropina no período pré-parto de novilhas leiteiras com elevada condição corporal sobre parâmetros metabólicos, restabelecimento da ovulação e produção de leite.

2.2 Qualificações do principal problema a ser abordado

O período de transição em vacas leiteiras é definido como três semanas antes até duas semanas após o parto (Grummer, 1995) sendo esta fase considerada crítica durante cada ciclo produtivo de vacas leiteiras de alta produção. As alterações fisiológicas que ocorrem durante a transição da gestação para a lactação têm uma grande influência sobre a saúde e o desempenho da vaca durante a lactação subsequente (Drackley, 1999). Uma mudança importante é a redução substancial na ingestão de matéria seca (IMS) durante a última semana de gestação (Bertics et al, 1992). Embora os mecanismos ainda não estejam bem entendidos, é amplamente aceito que o escore de condição corporal (ECC) está negativamente associado com a IMS (Roche et al., 2008). Devido a isso, a perda de ECC no pós-parto e intensidade do balanço energético negativo aumenta como aumento do ECC ao parto (Roche et al., 2007). Além do mais, Treacher et al. (1986), relataram que vacas moderadamente condicionadas ao parto produziram mais leite do que vacas gordas (2,8 vs 3,9; escala de 5 pontos). A queda na ingestão de nutrientes também está associada a mudanças no estado metabólico e hormonal (Drackley & Dann, 2005), resultando numa maior mobilização de lipídios do tecido adiposo, aumento da cetogênese e diminuição da disponibilidade de glicose, aminoácidos e ácidos graxos voláteis (Gulay et al, 2007).

A somatotropina recombinante bovina (rbST) é um hormônio homeorrético utilizado na regulação da partição de nutrientes, sendo administrado para aumentar a produção e melhorar a eficiência na síntese de leite (Bauman, 1999). Devido a esse potencial de produção gerado pelo rbST, o hormônio tem sido amplamente utilizado em vacas durante a lactação (McBride et al, 1989). Entretanto, pouco se sabe sobre as propriedades mamogênicas do rbST em novilhas no pré-parto. Segundo Stelwagen et al, (1991) o uso de rbST no pré-parto em novilhas proporcionou maior produção de leite na lactação subsequente.

O rbST é responsável por alterações no metabolismo da glicose, sendo esse efeito particularmente benéfico na fase final da gestação. No estudo de Bauman (1992) o uso de rbST ocasionou redução na oxidação da glicose nos tecidos periféricos e aumento da gliconeogênese hepática. Putnam et al, (1999) demonstraram que a aplicação de rbST no pré-parto resultou no aumento das concentrações de glicose e redução da concentração de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) e β -hidroxibutirato no pós-parto. Além do mais, a administração periparto de rbST induziu um aumento nas concentrações séricas de fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) por até 30 dias após o parto (Gulay et al., 2004).

O IGF-I circulante tem importante papel na reprodução, atuando na proliferação de células da granulosa e no crescimento de folículos antrais (Butler, 2005). Além disso, atua como regulador primário da produção de estradiol em bovinos (Butler et al., 2004). Em vacas leiteiras que ovulam precocemente, o nível de IGF-I plasmático é significativamente maior do que naquelas que apresentam atraso no retorno a ciclicidade (Butler et al., 2006; Kawashima et al., 2007). Echterkamp et al, (1990) demonstraram que a elevação nos níveis circulantes de IGF-I resultou em maiores taxas de concepção em bovinos. Com base nestas observações, a hipótese deste projeto baseia-se no uso de rbST no período pré-parto de novilhas leiteiras com alta condição corporal, a fim de diminuir a intensidade do BEN no periparto, aumentar a concentração de IGF-I e assim aumentar capacidade esteroidogênica do folículo dominante da primeira onda, assim diminuir o intervalo entre o parto e a primeira ovulação.

2.3 Objetivos e metas a serem alcançados

2.3.1 Objetivo geral

Verificar o efeito da administração de rbST no período pré-parto em novilhas leiteiras com alta condição corporal sobre o desenvolvimento folicular da primeira onda pós-parto e marcadores de balanço energético.

2.3.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar o efeito da administração pré-parto de rbST sobre os níveis sanguíneos de glicose, AGNE, insulina, β -hidroxibutirato, colesterol e IGF-I durante o período periparto;
- 2) Mensurar o efeito da administração pré-parto de rbST sobre o diâmetro do folículo dominante da primeira onda folicular pós-parto;
- 3) Quantificar o efeito da administração pré-parto de rbST sobre o intervalo parto-primeira ovulação;
- 4) Quantificar o efeito da administração pré-parto de rbST sobre a produção de leite da lactação subsequente;
- 5) Avaliar o efeito da administração pré-parto de rbST sobre a taxa de concepção em um protocolo de inseminação em tempo-fixado aos 55 dias pós-parto.

2.4 Metodologia e Estratégia de ação

Serão utilizadas 20 novilhas da raça Holandês, alocadas sob mesmas condições ambientais e de manejo em uma propriedade leiteira no sul do Brasil (32° 16' S, 52° 32' O, elevação 7 m). As novilhas serão inseminadas em tempo fixo de modo que os partos ocorram de maneira sincronizada. As novilhas serão divididas ao acaso em dois grupos; Grupo rbST ($n = 10$), que receberá duas aplicações de 500 mg de rbST (s.c., Boostin[®], LG Life Sciences, Seul, Coréia do Sul) (Licenciado no Ministério da Agricultura- Brasil sob nº 5.648 em 20/09/96) a primeira aplicação será feita 28 dias antes do parto e a segunda aplicação 14 dias antes do parto, e Grupo Controle ($n = 10$), receberá aplicações de placebo (2 ml de NaCl 0,9%) na mesma frequência, volume e local de aplicação que o Grupo rbST.

Serão realizadas 4 coletas de sangue pré-parto em intervalos de 7 dias, uma coleta no dia do parto e a cada 7 dias até o dia 42 pós-parto. As coletas serão feitas através da veia coccígea em tubos vacutainer. Os animais serão contidos em um brete de contenção individual, respeitando o seu bem estar (Dirksen et al, 1993). Imediatamente após a coleta os tubos serão centrifugados a 1000 xg por 15 min, o plasma será separado e armazenado a -80°C para posterior análise. No período pré-parto serão avaliadas as concentrações plasmáticas de glicose (Glicose PAP

Liquiform, Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil), AGNE (Wako NEFA-HR, WakoChemicals USA[®], Richmond, EUA) através de metodologia colorimétrica quantificada em espectrofotômetro, IGF-I (DSL-10-2800, Diagnostics Systems Laboratory[®], Webster, EUA) e insulina (DSL 10-600, Diagnostics Systems Laboratory[®], Webster, EUA) através da técnica de *enzyme-linked immuno sorbent assay* (ELISA). No período pós-parto serão avaliados os mesmos parâmetros descritos para o período pré-parto, além das concentrações de progesterona (IB-7905, Immuno-Biological Laboratories Inc., Minnesota, EUA), através da técnica de ELISA. No momento da coleta de sangue será avaliada a condição corporal por um único técnico treinado.

No período pós parto também será realizado o acompanhamento do desenvolvimento folicular através de exames ultrassonográficos, efetuados a cada 3 dias. Será utilizado aparelho de ultrassom equipado com transdutor linear endorectal bifrequencial 5.0-7.5 MHz. No momento do exame, o transdutor será movimentado sobre a superfície dos ovários e, quando apropriado, a imagem do monitor será congelada para a mensuração dos folículos e do corpo lúteo, Durante cada exame serão desenhados diagramas com o posicionamento relativo dos folículos de diâmetro igual ou maior a três mm (Savio *et al.*, 1988). O procedimento será realizado a partir do dia 10 pós-parto até o momento em que o folículo atingir diâmetro ovulatório (16 mm) ou ovular.

Além do mais no dia 45 pós-parto as vacas serão submetidas a um protocolo de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo (IATF). O protocolo está demonstrado na Figura 1. O diagnóstico de gestação será realizado por ultrassonografia 35 d após a IATF e a taxa de prenhez 30 dias após a IATF através de ultrassonografia.

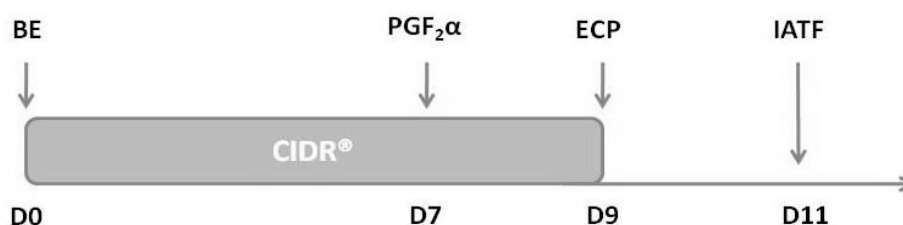


Figura 1 – Protocolo que será utilizado para sincronização das vacas iniciando aos 45 d pós-parto.

Os dados obtidos deste experimento serão analisados no programa estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, EUA). As médias serão analisadas através

do método MIXED MODELS, considerando o animal, o grupo e o período pré e pós-parto como efeitos fixos. A comparação de médias individuais será feita através do teste de Tukey-Kramer. Médias pontuais serão analisadas através do método One-way ANOVA. A correlação entre as variáveis será feita através do coeficiente de correlação de Pearson. Serão considerados significativos valores de $P < 0,05$.

2.5 Principais contribuições científicas e tecnológicas da proposta

2.5.1 Científicas

Este projeto visa contribuir para os estudos sobre o uso de rbST no período pré-parto de novilhas leiteiras com alta condição corporal e validá-la como uma estratégia, visando trazer benefícios na adaptação ao balanço energético negativo pós-parto, bem como contribuir para a redução do intervalo parto-ovulação.

Publicação de um artigo científico completo em periódico indexado da área com alto fator de impacto.

2.5.1 Tecnológicas

A validação do uso de rbST exógeno no período pré-parto pode constituir-se em uma alternativa para o produtor de leite, possibilitando o uso de rbST como estratégia para melhorar a adaptação e saúde animal no período de transição gestação-lactação. Assim como maior retorno econômico pelo aumento da produção de leite e antecipação da concepção, representando uma vantagem competitiva no mercado.

2.6 Cronograma físico-financeiro

Tabela 1– Cronograma de atividades para a execução do projeto.

Atividades	2012		2013	
	1º semestre	2º semestre	1º semestre	2º semestre
Revisão bibliográfica	X	X	X	X
Seleção dos animais	X		X	
Aplicação dos hormônios	X		X	
Acompanhamento dos animais e coletas de dados	X	X	X	X
Coleta de sangue	X		X	
Ultrassonografia ovariana	X		X	
Análises hormonais e bioquímicas		X	X	X
Análise de RNAm			X	X
Análise estatística			X	X
Preparação de artigos			X	X
Submissão de artigos			X	X
Reuniões semanais	X	X	X	X

2.7 Identificação dos demais participantes do projeto

Pesquisadores:

▪ Área de Reprodução Animal

- Luiz Francisco Machado Pfeifer, Médico Veterinário, Mestre em Veterinária e Doutor em Zootecnia, EMBRAPA CPAFRO;
- Ivan Bianchi, Médico Veterinário, Mestre em Zootecnia e Doutor em Biotecnologia Agrícola, UFPel;
- Augusto Schneider, Médico Veterinário, Mestre e Doutor em Biotecnologia, UFPel.

Os pesquisadores atuarão colaborando nas avaliações de parâmetros reprodutivos.

▪ Área de Bioquímica

- Francisco Augusto Burkert Del Pino, Graduação em Farmácia, Mestre e Doutor em Bioquímica.

O pesquisador irá colaborar na determinação do perfil hormonal e também dos marcadores bioquímicos propostos na metodologia.

▪ **Área de Clínica Médica**

- Charles Ferreira Martins, Médico Veterinário, Mestre em Reprodução animal e Doutor em Clínica Medica em Medicina Veterinária, UFPel;
- Carlos Eduardo Wayne Nogueira, Médico Veterinário, Mestre e Doutor em Medicina Veterinária, UFPel;
- Eduardo Schmitt, Médico Veterinário, Mestre e Doutor em Medicina Veterinária, UFPel.

Os pesquisadores irão colaborar na avaliação clínico-sanitária dos animais utilizados no estudo proposto.

▪ **Área de Nutrição Animal**

- Cássio Cassal Brauner, Médico Veterinário, Mestre e Doutor em Zootecnia, UFPel.

O pesquisador colaborará na avaliação do manejo nutricional e análises de composição das dietas.

Alunos de Pós-Graduação (orientação e co-orientação):

Os estudantes listados abaixo são atualmente orientados e co-orientados do proponente, sendo que destes, 2 mestrandos, serão envolvidos diretamente na condução das atividades experimentais, utilizando-se dos dados para a elaboração de tese e dissertação, respectivamente.

Os demais estudantes, por também participarem do Grupo de Pesquisa **NUPEEC - Transtornos metabólicos associados à clínica e a reprodução animal** (cadastrado nos diretórios de grupos de pesquisa do CNPq), colaborarão em atividades específicas do projeto, de acordo com sua formação e área de especialidade.

- Diego Andres Velasco Acosta, Médico Veterinário, Mestrando Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UFPel;

- Viviane Rohrig Rabassa, Médica Veterinária, Mestre em Veterinária, Doutoranda Programa de Pós-Graduação em Veterinária, UFPel;
- Elizabeth Schwegler, Médica Veterinária, Mestre em Veterinária, Doutoranda Programa de Pós-Graduação em Veterinária, UFPel;
- Rubens Alves Pereira, Graduação em Farmácia Industrial, Mestre em Biotecnologia, Doutorando Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFPel;
- Vinícius Coitinho Tabeleão, Médico Veterinário, Mestre em Veterinária, Doutorando Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFPel;
- Carolina Bernal Jacometo, Zootecnista, Mestranda Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UFPel;
- Simone Halfen, Bióloga, Mestranda Programa de Pós-Graduação em Veterinária, UFPel;
- Marina Menoncin Weschenfelder, Médica Veterinária, Mestranda Programa de Pós-Graduação em Veterinária, UFPel
- Lucas Teixeira Hax, Médico Veterinário, Mestrando Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, UFPel,
- Paula Montagner, Médica Veterinária, Mestranda Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, UFPel,
- Ana Rita Tavares Krause, Médica Veterinária, Mestranda Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UFPel

Alunos de Graduação em Medicina Veterinária:

Os estudantes listados abaixo atuam em diferentes projetos, vinculados às teses e dissertações desenvolvidas pelo Grupo de Pesquisa NUPEEC. No site do referido grupo (www.ufpel.edu.br/nupeec), são descritas as atividades em que os estudantes estão envolvidos visando favorecimento de sua formação profissional.

Os graduandos envolvidos no projeto são:

Aline Marangon de Oliveira, Andressa Stein Maffi, Camila Pizoni, Claudia Faccio Demarco, Dante Ferrari Frigotto, Douglas Perazzoli, Fabiane Pereira de Moraes, Fernanda Trindade da Rosa, Guilherme Nunes Bolzan, Ismael Mateus Cavazini,

Lucas Carbonari, Marcos Rossi, Patrícia Mattei, Samanta Regine Fensterseifer, Vinícius Boechel Barcelos.

2.8 Disponibilidade efetiva de infraestrutura e de apoio técnico

As infraestruturas citadas abaixo serão utilizadas nas diferentes atividades experimentais que serão realizadas na UFPel. Também destacamos que as equipes de pesquisadores listados anteriormente, bem como técnicos e estudantes de seus grupos de pesquisa, irão colaborar dando suporte técnico às atividades propostas neste projeto.

- Laboratório de Patologia Clínica/Hospital de Clínicas Veterinária - UFPel
- Laboratório de Reprodução - Faculdade de Veterinária - UFPel
- Laboratório de Bioquímica Aplicada - UFPel

Além dessas infraestruturas, destacamos que algumas análises serão realizadas em outros centros de pesquisa, já citados:

- Laboratório do Departamento de Patologia e Clínica Veterinária - UFRGS

2.9 Estimativa dos recursos financeiros de outras fontes

No nosso entendimento esta proposta apresenta um caráter incremental ao conhecimento da fisiologia reprodutiva e metabólica da fêmea bovina no período de transição, por tudo que foi abordado na caracterização da proposta. Também poderá servir de base para que outros estudos sejam conduzidos (seja com o uso ou não de hormônios), uma vez que estudos ligados a endocrinologia, principalmente, de parâmetros metabólicos de fêmeas bovinas, ainda devem ser conduzidos, uma vez que o desempenho reprodutivo da fêmea influenciará no desempenho produtivo dos sistemas comerciais.

Por esse aspecto, empresas não serão envolvidas inicialmente neste projeto. Porém, como acreditamos que os resultados desta proposta poderão trazer algum benefício para empresas multiplicadoras de genética e para empresas da área de farmacologia veterinária, pretendemos buscar a interação com empresas destas áreas, tendo primeiramente trazido contribuição para a comunidade científica e depois, num segundo momento, se buscará financiamentos na iniciativa privada,

para que tenhamos uma continuidade dos estudos ligados à hipótese central desta proposta. Também gostaríamos de destacar que nessa mesma estratégia temos desenvolvido vários estudos, buscando interação com a iniciativa privada e favorecendo o financiamento de projetos. Destacamos, porém, que os trabalhos que temos realizado também contam com recursos provenientes dos Programas de Pós-graduação em que temos ligação e de editais das instituições fomentadoras de pesquisa em nosso estado e país.

2.10 Referências Bibliográficas

Bauman, D.E. 1992. Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. *J. Dairy Sci.* 75:3432–3451.

Bauman D.E. 1999. Bovine somatotropin and lactation: From basic science to commercial application. *Domes AnimEndocrinol*17:101–116.

Bauman, D. E, W. B. Currie. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, v. 63(9), p. 1514-1529.

Bertics, S. J., R. R. Grummer, C. Cadornigavalino, and E. E. Stoddard. 1992. Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. *J. Dairy Sci.* 75:1914.

Butler, S. T.; Peltron, S. H.; Butler, W. R., 2004. Insulin increases 17 β -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction*.127, 537-545.

Butler WR. 2005. Inhibition of ovulation in the postpartum cow and the lactating sow. *Livestock Production Science*.98:5 –12.

Dirksen G., Gründer H.D. &Stöber M. 1993.Rosenberger, ExameClínico dos Bovinos.3^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 419p.

Drackley, J. K. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *J. Dairy Sci.* 82:2259–2273.

Drackley, J. K., and H. M. Dann. 2005. New concepts in nutritional management of dry cows. *Adv. Dairy Technol.* 17:11–23.

Echternkamp SE, Spicer LJ, Gregory KE, Canning SF, Hammond JM. 1990. Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *BiolReprod*; 43:8 –14.

Etherton, T. D., and D. E. Bauman. 1998. Biology of somatotropina in growth and lactation of domestic animals. *Physiol. Rev.* 78:745–761.

Gerloff, B. I., T. H. Herdt. and R S. Emery. 1986. The relationship of hepatic lipidosis to health and performame in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188:845.

Gulay M. S., Liboni M., Hayen M. J. and Head H. H. 2007. Supplementing Holstein Cows with Low Doses of Bovine Somatotropin Prepartum and Postpartum Reduces Calving-Related Diseases.*J. Dairy Sci.* 90:5439–5445

Grummer, R.R. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition cow. *Journal of Animal Science*, 73, 2820–2833.

Jiang, H., Lucy, M. C. 2001 Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency. *Gene*, v. 265(1-2), p. 45-53.

Kawashima, C., Fukihara, S., Maeda, M., Kaneko, E., Montoya, C.A., Matsui, M., Shimizu, T., Matsunaga, N., Kida, K., Miyake, Y., Schams, D., Miyamoto, A., 2007. Relationship between metabolichormonesandovulationofdominantfollicleduringthefirstfollicularwave post-partum in high-producingdairycows. *Reproduction* 133, 155-163.

Kobayashi, Y., Boyd, C.K., Bracken, C.J., Lamberson, W.R., Keisler, D.H., Lucy, M.C., 1999. Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 140, 3947-3954.

McBride, B. W., I. L. Burton, and J. H. Burton. 1988. The influence of bovine growth hormone (somatotropin) on animals and their products. *Res. Dev. Agric. S:l.*

Radcliff, R.P., McCormack, B.L., Crooker, B.A., Lucy, M.C., 2003. Growthhormone (GH) bindingandexpressionof GH receptor 1A mRNA in hepatic tissue of periparturient dairycows. *J. Dairy Sci.* 86, 3933-3940.

Reist, M., Erdin, D., von, E.D., Tschuemperlin, K., Leuenberger, H., Delavaud, C., Chilliard, Y., Hammon, H.M., Kuenzi, N., Blum, J.W., 2003. Concentrate feeding strategy in lactating dairy cows: metabolic and endocrine changes with emphasis on leptin. *J. Dairy Sci.* 86, 1690-1706.

Renaville R, Hammadi M, Portetelle D. 2002. Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. *Domest Anim Endocrinol.* 23:351–360.

Pfaffl, M.W., Georgieva, T.M., Georgiev, I.P., Ontsouka, E., Hageleit, M., Blum, J.W., 2002. Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domest. Anim Endocrinol.* 22, 91-102.

Putnam, D.E., Varga, G.A., Dann, H.M. 1999. Metabolic and production responses to dietary protein and exogenous somatotropin in late gestation dairy cows. *J Dairy Sci* 82, 982-995.

Roche, J. R., D. P. Berry, J. M. Lee, K. A. Macdonald, and R. C. Boston. 2007. Describing the body condition score change between successive calvings: A novel strategy generalizable to diverse cohorts. *J. Dairy Sci.* 90:4378–4396.

Roche, J. R., D. Blache, J. K. Kay, D. R. Miller, A. J. Sheahan, and D. W. Miller. 2008. Neuroendocrine and physiological regulation of intake, with particular reference to domesticated ruminant animals. *Nutr. Res. Rev.* 21:207–234.

Savio, J. D., L. Keenan, M. P. Boland and J. F. Roche. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83: 663.

Treacher RJ, Reid IM, Roberts CJ. 1986. Effect of body condition at calving on the health and performance of dairy cows. *Anim. Prod*, 43: 1- 6

3. Relatório de Trabalho de Campo

3.1 Período do experimento

O experimento teve início no mês de junho de 2010 com o acompanhamento das novilhas que iriam parir no mês de julho, com a finalidade de identificar e selecionar as novilhas que encontravam-se com escore de condição corporal (ECC) maior que 3,5 (escala de 1-5). O período de parição foi de julho a agosto de 2010. Em junho começaram as aplicações de rbST (s.c., Boostin[®], LG Life Science, Seul, Coréia do Sul) que se estenderam até o mês de julho de 2010. No mesmo dia da aplicação de rbST começaram as coletas de sangue e seguiram até o mês de outubro. A partir do final de julho foi realizado o acompanhamento do desenvolvimento folicular através de exames ultrassonográficos, efetuados a cada 3 dias, o qual se estendeu até a metade de outubro de 2010. Do mês de julho até o mês de outubro de 2010 foi feito o acompanhamento da produção de leite.

3.2. Fazenda experimental

O experimento foi conduzido em uma fazenda particular no município de Rio Grande (32° 16' S, 52° 32' O, elevação 7 m), no estado de Rio Grande do Sul. A região é formada basicamente por planícies e por algumas áreas conhecidas como banhados, leves depressões que alagam durante as temporadas de chuva.

O clima do município é subtropical ou temperado, com verões moderados e invernos frios. O mês mais quente é janeiro, com temperatura média de 28°C, enquanto o mês mais frio é julho, com média de 5°C. A temperatura média anual é de 16,5°C e a precipitação média anual é de 1.196 mm. Regularmente, as chuvas são distribuídas durante todo o ano com mais frequência no inverno.

Ultimamente, o clima vem sofrendo algumas alterações. Seus invernos cada vez mais frios, com a temperatura chegando até a -1°C, e seus verões mais quentes atingindo valores de 35°C.

3.3. Animais

Foram utilizadas 20 novilhas de produção leiteira, da raça Holandês, com idade média de 29 meses, de tamanho uniforme, apresentando condição corporal > 3,5 (escala de 1 a 5). Os animais foram mantidos em campo natural no início do período experimental. Após o parto passaram para campo com pastagem de azevém e trevo branco, onde permaneceram até fim do período experimental. As novilhas foram inseminadas utilizando sêmen de touro da mesma raça (Holandês) para o controle da data de concepção das vacas e agrupamento dos parto.

3.5. Protocolo de Ultrassonografia

No período pós parto foi realizado o acompanhamento do desenvolvimento folicular, através de exame transretal com um aparelho de ultrassonografia, utilizando uma sonda de 7,5 MHz matriz linear (Pie Medical, Maastricht, Países Baixos). Foi realizada a cada 3 dias, no período pós-parto, iniciando no dia 10 até a ovulação. Em cada exame, um desenho de cada ovário foi feito, e o diâmetro e localização de folículos > 3 mm de diâmetro foram registrados. A ovulação foi definida como o desaparecimento (a partir de um próximo exame) de um folículo previamente identificado > 8 milímetro de diâmetro juntamente com a detecção de um corpo lúteo no mesmo ovário em um exame mais aprofundado.

4. Artigo

Effect of *prepartum* somatotropin injection in late pregnant Holstein heifers with high body condition score on metabolic parameters, resumption of ovulation and milk production

D.A.V. Acosta^{1,6}, L.F.M. Pfeifer^{3,6}, E. Schmitt^{2,6}, A. Schneider^{2,6}, P.A.S. Silveira^{2,6}, C.B. Jacometo^{1,6}, M.N. Corrêa^{2,6} and F.A.B. Del Pino^{4,6}

¹*Department of Animal Science, Federal University of Pelotas, Campus Universitário, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil;*

²*Department of Veterinary Clinics, Veterinary College, Federal University of Pelotas, Campus Universitário, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil;*

³*Brazilian Agricultural Research Corporation, EMBRAPA, BR 364 - Km 5.5, CEP 76815-800, Porto Velho, RO, Brazil*

⁴*Department of Biochemistry, Federal University of Pelotas, Campus Universitário, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil;*

⁶*Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Veterinary College, Federal University of Pelotas, Campus Universitário, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil*

Corresponding Author: MarcioNunesCorrêa. E-mail: marcio.nunescorrea@gmail.com

Running head: *Prepartum* somatotropin and metabolic parameters

Abstract

The aim of this study was to determine the effect of *prepartum* recombinant bovine somatotropin (rbST) treatment on follicular development of the first *postpartum* follicle wave and energy balance markers in dairy heifers. Holstein heifers (n=20) with high body condition score (BCS) (Scale 1-5; BCS>3.5) were divided randomly into two groups: somatotropin group (n=10) that received two doses of 500 mg of rbST at -28 and -14 d from calving; and Control group that (n=10) received applications of placebo in a similar manner to somatotropin group. Blood samples were collected weekly from -28 to + 42 days after calving for evaluation of β -hydroxybutyrate (BHBA) and non-esterified fatty acids (NEFA) concentrations. Follicular development was also monitored via ultrasound examinations starting at 10 d *postpartum* and every 3 d until ovulation. There was a day by group interaction for plasma NEFA concentrations during the *prepartum* period (P=0.03) and a tendency for the day (P=0.07) but no effect on the group (P=0.35). There was only an effect of the week (P<0.001) for *postpartum* NEFA concentrations. *Postpartum* NEFA concentration was higher at days 0, 7 and 14 than at 21, 28, 35 and 42 (P<0.05). For pre and *postpartum* BHBA there was no effect of day (P=0.56 and 0.15, respectively), group (P=0.20 and 0.44, respectively) or day by group (P=0.57 and 0.56, respectively). *Prepartum* somatotropin administration did not affect (P=0.28) the moment of the first *postpartum* ovulation. The proportion of cows ovulating the first follicular wave *postpartum* was not different between groups (P=0.49). There was no effect (P>0.05) of *prepartum* treatment on the diameter of the first *postpartum* dominant follicle. Milk production was not affected by *prepartum* somatotropin treatment (P=0.14). In conclusion, *prepartum* somatotropin treatment in dairy heifers with high body

condition had no effect on markers of energy balance or development of the first follicular wave in the *postpartum* period.

Key words: rbST; heifers; NEFA; BHBA.

Implications

Metabolic adaptations during the transition period can have a great impact on health and performance. In our study *prepartum* injection of somatotropin in dairy heifers with high body condition score (BCS) did not reduced *postpartum* negative energy balance. In this way, we did not observe a higher proportion of somatotropin treated heifers ovulating earlier. In addition, the heifers treated with somatotropin did not increased milk production as observed in previous studies using cows with lower BCS. Thus, the use of *prepartum* somatotropin in heifers with high BCS does not seem to be good strategy for increasing milk production.

Introduction

In the early lactation of dairy cows the energy demands increase and exceed the intake capacity inducing a stage of negative energy balance (NEB) (Bauman and Currier, 1980). The collective literature makes a compelling case for an optimum BCS at calving for milk production of between 3.0 and 3.5 in Holstein-Friesian dairy cows, with further increases resulting in reductions in milk yield (Roche et al., 2009; Treacher et al. 1986). Although the mechanisms are not well understood, it is widely accepted that higher BCS is negatively associated with the dry matter intake (DMI) (Roche et al. 2008). Moreover, the loss of BCS during the *postpartum* period and intensity of NEB increases as the BCS at calving increases (Roche et al. 2007).

In addition to BCS control, others strategies have been used in the transition

period for dairy cows to support the metabolic alterations (Overton and Waldron, 2004). In this sense the supplementation of cows with low doses of somatotropin during the periparturient period has been associated with possible beneficial effects on the physiological adaptations and liver function (Gulay et al., 2003; Gulay et al., 2004). Putnam et al. (1999) showed that *prepartum* injection of somatotropin increased *postpartum* DMI and resulted in increased concentrations of glucose and reduced concentration of non-esterified fatty acids (NEFA) and β -hydroxybutyrate (BHBA) at the *postpartum* period. This indicates that somatotropin can improve metabolic adaptation in transition dairy cows. Somatotropin regulates nutrient partitioning, and is traditionally used to increase milk production and improve the efficiency of milk synthesis in the *postpartum* period (Bauman, 1999).

In early *postpartum* dairy cows, the duration and intensity of NEB, the level of BCS loss and the milk yield are strongly associated to the timing of the first ovulation (Butler, 2003; Wathes et al., 2007). As a consequence, strategies that minimize NEB and BCS loss in the early *postpartum* period could have a positive impact on the timing of the first ovulation and conception rate. Administration of somatotropin in the peripartum period induced an increase in serum insulin-like growth factor I (IGF-I) (Putnam et al., 1999; Carriquiry et al., 2009; Scheneider et al., 2011). The circulating IGF-I plays an essential role in reproduction (Velazquez et al., 2008). The blood level of IGF-I is related to return to *postpartum* ovarian activity (Butler et al., 2006) and embryo survival (Velazquez et al. 2005). In addition, IGF-I acts on the growth and differentiation of antral follicles (Rivera and Fortune, 2003). These studies indicate that *prepartum* injection of somatotropin is a potential tool to improve metabolic adaptation of transition dairy cows, and thus can have a positive impact on early

postpartum ovulation as demonstrated for lean cows treated with *prepartum* somatotropin (Schneider et al. 2011).

Based on these observations, the objective of this study was to determine the effect of *prepartum* injections of somatotropin in dairy heifers with high BCS on the markers of NEB, resumption of ovarian activity and milk production.

Materials and methods

All procedures performed in this experiment were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation from the Universidade Federal de Pelotas (Pelotas, RS, Brazil).

Experimental design

For this study 20 late pregnant Holstein heifers were used in a commercial dairy herd in southern Brazil (32° 16' S, 52° 32' W). The selected heifers for this experiment were of a large group of heifers with different BCS, the 20 selected had body condition score of 3.55 ± 0.15 (scale from 1.0 to 5.0) the BCS was evaluated by three technician sat the beginning of the experiment. All calvings occurred in a 40 days interval during the winter season.

At -28 days from expected calving the heifers were assigned randomly into two groups; 1) 500 mg of somatotropin (Boostin[®], LG Life Sciences, Seoul, Korea) sc (Somatotropin group, n = 10) at Days -28 and -14, from expected calving date; and 2) no treatment (Control group, n = 10). All heifers were managed under the same conditions and nutritional regimen.

Sample collection, measurement and analyses

Blood samples were collected weekly from -28 from expected calving to 42 days in milk (DIM) via venipuncture of the coccygeal vein in one tube without

anticoagulant. Samples were collected in the interval after milking and before feeding. In the *postpartum* period heifers were milked twice daily at 0330 and 1530. The production was recorded daily (Alpro[®], DeLaval, Kansas City, USA) and combined for weekly averages.

Concentrations of BHBA and NEFA were measured colorimetrically using commercial kits, BHBA (β -HB, Catachem Inc., Bridgeport, CT) and NEFA-HR (Wako USA, Richmond, USA) by the micro-method described by Ballou et al. (2009). The intra and inter-assay coefficient of variation (CV) for, BHBA and NEFA were less than 10%.

Reproductive management and ultrasonography evaluations

Transrectal ultrasonography examination was performed using a 7.5-MHz linear array probe (Pie Medical, Maastricht, Netherlands) every 3 days from 10 DIM up to ovulation in 17 females (Somatotropin group, n = 8; Control group, n = 9). At each examination, a sketch of each ovary was made, and the diameter and location of follicles > 3 mm in diameter were recorded (Ginther et al. 1989). Ovulation was defined as the disappearance (from one examination to the next) of a previously identified follicle > 8 mm in diameter (Martinez et al. 2005) along with the detection of a CL in the same ovary in a further examination.

Cows were further divided disregarding somatotropin treatment and the groups were divided according to ovulation of the dominant follicle of the first postpartum wave. The groups were designated as cows that ovulated the first wave (OFW) or cows that had not ovulated the first wave (NOFW).

Statistical analyses

The results are presented as means \pm standard error of the mean (SEM). All statistical analyses were performed using SAS (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

Analyses involving repeated measures over time (e.g. NEFA, BHBA and milk production) were compared between treatments by analysis of variance for repeated measures using the MIXED procedure to evaluate the main effects of time, treatment, and their interactions (Littell et al. 1998). The statistical models and data analyses were designed and performed separately for the pre and *postpartum* periods. When the interaction between treatment and time was significant ($P < 0.05$), pair-wise comparison of individual means was conducted. Percentage of cows ovulating the first wave, OFW and NOFW were analyzed by chi-square. Diameter of dominant follicle the first wave *postpartum* and the day of first *postpartum* ovulation was analyzed by One-way ANOVA. A value of $P < 0.05$ was considered significant and a value of between 0.05 and 0.1 was considered as a tendency.

Results

There was a day by group interaction for plasma NEFA concentrations during the *prepartum* period ($P = 0.03$) and a tendency for the day ($P = 0.07$) but no effect of the group ($P = 0.35$). There was only an effect of the day ($P < 0.001$) for *postpartum* NEFA concentrations. *Postpartum* NEFA concentration was higher at 0, 7 and 14 DIM than at 21, 28, 35 and 42 DIM ($P < 0.05$) (Figure 1). For pre and *postpartum* BHBA there was no effect of day ($P = 0.56$ and 0.15 , respectively), group ($P = 0.20$) and 0.44 , respectively) or day by group ($P = 0.57$ and 0.56 , respectively) (Figure 1). Milk production was not different between control (17.53 ± 0.66 kg/cow/day) and somatotropin groups (16.13 ± 0.67 kg/cow/day) ($P = 0.14$).

[Figure 1]

Prepartum somatotropin administration did not affect the moment of the first *postpartum* ovulation ($P=0.28$), proportion of cows ovulating the first follicular wave ($P=0.49$) or diameter of the first *postpartum* dominant follicle ($P=0.37$).

When divided by ovulation of the first wave, 5 cows ovulated during the first wave (29.41%), while 12 (70.58 %) did not. The interval between calving and first ovulation was 18.9 ± 1.6 days for OFW cows and 39.0 ± 2.3 days for NOFW cows ($P<0.01$). Plasma concentration of NEFA and BHBA was not different between OFW and NOFW cows. In addition, the daily milk yield during the experimental period was not different between these two groups.

Discussion

In the present study mean concentration of NEFA and BHBA did not differ significantly between groups during the *prepartum* period, and no significant increase in NEFA and BHBA concentrations was observed at the *postpartum* period. This observation is similar to the related data described by Gulay et al. (2003). The effect of *prepartum* somatotropin injection on *postpartum* concentrations of NEFA and BHBA is controversial. While some report a positive effect (Putnam et al., 1999 and Schneider et al., 2011), others found no relationship (Vallimont et al. 2001). The concentration of NEFA and BHBA are commonly used markers of NEB and ketosis in transition dairy cows (Ospina et al. 2010). Cows with high milk production have more energy demand and mobilize more body reserves to overcome the greater energy requirements, which exacerbate the changes in metabolic and hormonal factors during early lactation (Butler, 2003; Veerkamp et al., 2003). In this study there was no significant increase in NEFA or BHBA, which indicate that these cows were not in

a severe NEB and can explain the lack of effect of *prepartum* somatotropin as compared to other studies (Putnam et al., 1999; Schneider et al., 2011).

Milk production was not increased by *prepartum* somatotropin treatment. Similarly, Eppard et al. (1996) did not observed increased milk production in Holstein and Jersey cows that received a full dose of somatotropin during 28 days at the *prepartum* period. However, cows in that study also were used for milk fever induction, which may have affected milk production responses. In another study, Bachman et al. (1992) concluded that milk yield of treated and control cows did not differ due to *prepartum* injections of 25mg of somatotropin/day. In contrast, Putnam et al. (1999) observed that cows treated with somatotropin (500mg/day) starting 28 days before the expected calving date through parturition, produced 3.3 kg/d more milk than controls during the first 42 days of lactation and Schneider et al. (2011) observed similar increases of 2.8 kg/cow per day. However, is important to notice that our study used exclusively obese cows and this could have affected the results.

Somatotropin treatment did not increase the number of heifers that ovulated the first *postpartum* wave, and did not anticipated resumption of ovulation. This is in contrast with Schneider et al. (2011) findings, who observed that, using heifers with moderate BCS, a higher number of heifers in the somatotropin treatment group ovulated the first *postpartum* dominant follicle. Several studies have reported that NEB and its markers NEFA, BHBA and IGF-I have a strong association with reproductive performance and milk production (Reist et al., 2003; Walsh et al., 2007; Wathes et al., 2007). In the present study NEFA and BHBA concentrations or even milk production did not differ between groups, which may explain why no significant difference was found for the moment of the first *postpartum* ovulation.

In conclusion, somatotropin injection during the *prepartum* period in late pregnant Holstein heifers with high BCS did not reduce the interval between calving and the first ovulation and did not increase milk production during the first 9 weeks *postpartum*. In addition, it also did not improve parameters that indicate that these heifers had a less severe NEB during the early *postpartum* period as demonstrated for lean cows in previous reports.

Acknowledgements

The authorsthankto Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), for the financial support. To Granja 4 Irmãos S/A that provided cows and farm facilities.

Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

References

- Bachman KC, Wilfond DH, Head HH, Wilcox CJ and Singh M 1992. Milk yields and hormone concentrations of Holstein cows in response to Sometribove (Somatotropin) treatment during the dry period. *Journal of Dairy Science* 75, 1883–1890.
- Ballou MA, Gomes RC, Juchem SO and DePeters EJ 2009. Effects of dietary supplemental fish oil during the peripartum period on blood metabolites and hepatic fatty acid compositions and total triacylglycerol concentrations of multiparous Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 92, 657-669.
- Bauman DE 1999. Bovine somatotropin and lactation: from basic science to

commercial application. *Domestic Animal Endocrinology* 17,101-116.

Bauman DE and Currie WB 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science* 63, 1514-1529.

Butler ST, Pelton SH and Butler WR 2006. Energy balance, metabolic status, and the first *postpartum* ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *Journal of Dairy Science* 89, 2938-2951.

Butler WR 2003. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in *postpartum* dairy cows. *Livestock Science*, 211-218.

Carrquiry M, Weber WJ, Dahlen CR, Lamb GC, Baumgard LH and Crooker BA 2009. Production response of multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed diets enriched with n-3 or n-6 fatty acids. *Journal of Dairy Science* 92, 4852-4864.

Eppard P J, Veenhuizen JJ, Cole WJ, Comens-Keller PG, Hartnell GF, Hintz LR, Munyakazi L, Olsson PK, Sorbet RH, White TC, Baile CA, Collier RJ, Goff PJ, and Horst RL 1996. Effect of bovine somatotropin administered to peripartur-ient dairy cows on the incidence of metabolic disease. *Journal Dairy Science* 79, 2170–2181.

Ginther OJ, Knopf L and Kastelic JP 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility* 87, 223-230.

Gulay MS, Hayen MJ, Teixeira LC, Wilcox CJ and Head HH 2003. Responses of Holstein cows to a low dose of somatotropin (bST) *prepartum* and *postpartum*. *Journal of Dairy Science* 86, 3195-3205.

Gulay MS, Hayen MJ, Liboni M, Belloso TI, Wilcox CJ and Head HH 2004. Low doses of bovine somatotropin during the transition period and early lactation

improves milk yield, efficiency of production, and other physiological responses of Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 87, 948-960.

Littell RC, Henry PR and Ammerman CB 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science* 76, 1216-1231.

Martinez MF, Kastelic JP, Bó GA, Caccia M and Mapletoft RJ 2005. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Animal Reproduction Science* 86, 37-52.

Ospina PA, Nydam DV, Stokol T and Overton TR 2010. Associations of elevated nonsterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science* 93, 1596-1603

Overton TR and Waldron MR 2004. Nutritional management of Transition dairy cows: Strategies to optimize metabolic health. *Journal of Dairy Science* 87, E105-E119.

Putnam DE, Varga GA and Dann HM 1999. Metabolic and production responses to dietary protein and exogenous somatotropin in late gestation dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82, 982-995.

Reist M, Erdin DK, von Euw D, Tschumperlin KM, Leuenberger H, Hammon HM, Morel C, Philipona C, Zbinden Y, Kunzi N and Blum JW. 2003. *Postpartum* reproductive function: Association with energy, metabolic and endocrine status in high yielding dairy cows. *Theriogenology* 59, 1707–1723.

Rivera GM and Fortune JE 2003. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology* 144, 2977-2987.

Roche JR, Berry DP, Lee MJ, Macdonald KA and Boston RC 2007. Describing the body condition score change between successive calvings: A novel strategy

generalizable to diverse cohorts. *Journal of Dairy Science* 90, 4378–4396.

Roche JR, Blache D, Kay JK, Miller DR, Sheahan AJ and Miller DW 2008. Neuroendocrine and physiological regulation of intake, with particular reference to domesticated ruminant animals. *Nutrition Research Reviews* 21, 207–234.

Roche JR, Friggens NC, Kay JK, Fisher MW, Stafford KJ and Berry DP 2009. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science* 92, 5769–5801.

Schneider A, Schwegler E, Montagner P, Hax LT, Schmitt E, Pfeifer LFM, Del Pino FAB, Bianchi I, Paludo GR and Corrêa MN. Effect of *prepartum* somatotropin injection in late-pregnant Holstein heifers on metabolism, milk production and *postpartum* resumption of ovulation. *Animal*, doi :10.1017/S1751731111002321, published online by Cambridge University Press 28 October 2011.

Treacher RJ, Reid IM and Roberts CJ 1986. Effect of body condition at calving on the health and performance of dairy cows. *Animal Production* 43, 1- 6

Vallimont JE, Varga GA, Arieli A, Cassidy TW and Cummins KA 2001. Effects of *prepartum* somatotropin and monensin on metabolism and production of periparturient Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 84, 2607–2621.

Veerkamp RF, Beerda B and van der Lende T 2003. Effects of genetic selection for milk yield on energy balance, levels of hormones, and metabolites in lactating cattle, and possible links to reduced fertility. *Livestock Production Science* 83, 257–275.

Velazquez MA, Newman M, Cripps MFP, Crowe MA, Smith RF and Dobson H 2005. The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. *Theriogenology* 64, 1977-1994.

Velazquez MA, Spicer LJ, and Wathes DC 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domestic Animal Endocrinology* 35, 325-342.

Walsh RB, Walton JS, Kelton DF, LeBlanc SJ, Leslie KE and T. F. Duffield TF 2007. The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of *postpartum* dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90, 2788–2796.

Wathes DC, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris DG, Kenny D, Murphy J and Fitzpatrick R 2007. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology* 68 Suppl 1, S232-241.

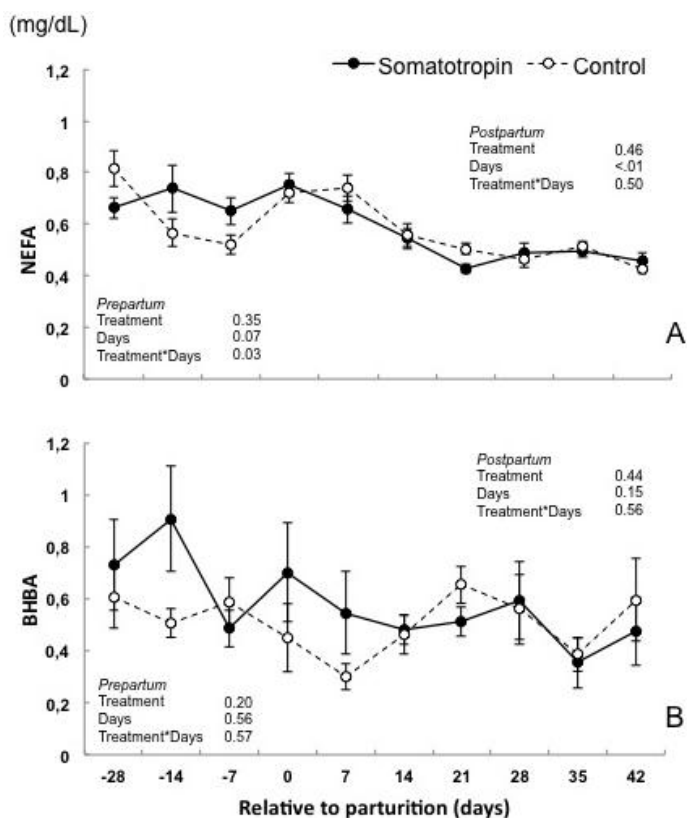


Figure 1, Plasma concentrations of NEFA (A) and BHBA (mg/dL) (B) from -28 to 42 days from calving for somatotropin treated (●) or control heifers (○).

5. Conclusão geral

Em conclusão, a administração de somatotropina durante o período pré-parto de novilhas da raça Holandês com elevado escore de condição corporal não reduziu o intervalo entre parto ea primeira ovulação, e não aumentou a produção de leite durante as primeiras 9 semanas após o parto. Além disso, a administração de somatotropina não melhorou os parâmetros que indicam que estas novilhas tiveram um balanço energético negativomenos intenso durante o período pós-parto.

6. Referências bibliográficas

- ARMSTRONG, D. G., WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Reviews of Reproduction**, v. 2(3), 139-146. 1997.
- BAUMAN, D.E., EPPARD, P.J., DEGEETER, M.J., LANZA, G.M. Responses of high-producing dairy cows to long-term treatment with pituitary somatotropin and recombinant somatotropin. **J Dairy Sci** 68, 1352-1362. 1985
- BAUMAN, D. E. Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. **J Dairy Sci**, v.75, p. 3432–3451. 1992.
- BAUMAN, D. E., CURRIE, W. B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **J Dairy Sci**, v. 63(9), 1514-1529. 1980.
- BAUMAN, D. E., VERNON, R. G. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. **Annual Reviews of Nutrition**, v. 13, 437-461. 1993.
- BEEVER, D. E. The impact of controlled nutrition during the dry period on dairy cow health, fertility and performance. **Anim Reprod Sci**, v. 96, 212–226. 2006.
- BUTLER, S. T., MARR, A. L., PELTON, S. H., RADCLIFF, R. P., LUCY, M. C., BUTLER, W. R. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. **Journal of Endocrinology**, v. 176(2), 205-217. 2003.
- BUTLER, S. T., PELTON, S. H., BUTLER, W. R. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. **J Dairy Sci**, v. 89(8), 2938-2951. 2006.
- BUTLER, W. R., SMITH, R. D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. **J Dairy Sci**, v. 72(3), 767-783. 1989.
- BROWN K. L. CASSELL B. G. MCGILLIARD M.L. HANIGAN M.D. GWAZDAUSKAS F. C. Hormones, metabolites, and reproduction in Holsteins, Jerseys, and their crosses. **J Dairy Sci**, v. 95, 698-707. 2012.
- CARRIQUIRY, M., WEBER, W. J., DAHLEN, C. R., LAMB, G. C., BAUMGARD, L., H., CROOKER, B. A. Production response of multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed diets enriched with n-3 or n-6 fatty acids. **J Dairy Sci**, v.92, 4852-4864. 2009.
- DRACKLEY, J. K., DANN H. M. New concepts in nutritional management of dry cows. **Adv. Dairy Technol.** v. 17, 11–23. 2005.

EL-ROEIY, A., CHEN, X., ROBERTS, V. J., SHIMASAKAI, S., LING, N., LEROITH, D., ROBERTS, C. T., JR., YEN, S. S. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. **J Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 78(6), 1488-1496. 1994.

FENWICK, M. A., FITZPATRICK, R., KENNY, D. A., DISKIN, M. G., PATTON, J., MURPHY, J. J., WATHES, D. C. Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34(1), 31-44. 2008.

GRUMMER, R.R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition cow. **J AnimSci**, 73, 2820–2833. 1995.

GULAY, M.S., HAYEN, M.J., TEIXEIRA, L.C., WILCOX, C.J., HEAD, H.H. Responses of Holstein cows to a low dose of somatotropin (bST) prepartum and postpartum. **J Dairy Sci**, v. 86, 3195-3205. 2003.

GULAY, M.S., HAYEN, M.J., LIBONI, M., BELLOSO, T.I., WILCOX, C.J., HEAD, H.H. Low doses of bovine somatotropin during the transition period and early lactation improves milk yield, efficiency of production, and other physiological responses of Holstein cows. **J Dairy Sci**, v. 87, 948-960. 2004.

GULAY, M. S., LIBONI, M., HAYEN, M. J., HEAD, H. H. Supplementing Holstein Cows with Low Doses of Bovine Somatotropin Prepartum and Postpartum Reduces Calving-Related Diseases. **J Dairy Sci**. v. 90, 5439–5445. 2007.

GUO, J., PETERS, R.R., KOHN, R.A. Effect of a transition diet on production performance and metabolism in periparturient dairy cows. **J Dairy Sci**. 90, 5247-5258. 2007.

JIANG, H., LUCY, M. C. Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency. **Gene**, v. 265(1-2), 45-53. 2001.

JONES, J. I., CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, v. 16(1), 3-34. 1995.

KAWASHIMA, C., FUKIHARA, S., MAEDA, M., KANEKO, E., MONTOYA, C. A., MATSUI, M., SHIMIZU, T., MATSUNAGA, N., KIDA, K., MIYAKE, Y., SCHAMS, D., MIYAMOTO, A. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. **Reproduction**, v. 133(1), 155-163. 2007.

KIRBY, C. J., THATCHER, W. W., COLLIER, R. J., SIMMEN, F. A., LUCY, M. C. Effects of growth hormone and pregnancy on expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 genes in bovine uterus, ovary, and oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 55(5), 996-1002. 1996.

NETO, J.G.; FERNANDES, S.A.A.; SILVA, F.F.; PEDREIRA, M.S. Uso da Somatotropina Bovina em búfalas: Efeitos sobre a produção e composição do leite. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 5, 1056-1071, 2009.

OVERTON, T. R., WALDRON, M. R. Nutritional management of Transition dairy cows: Strategies to optimize metabolic health. **J Dairy Sci**, v. 87, p. 105-119. 2004.

PETIT, H. V., M. F. PALIN, AND L. DOEPEL. Hepatic lipid metabolism in transition dairy cows fed flaxseed. **J. Dairy Sci**, v. 90 4780– 4792. 2007.

PIRES, J.A.A., PESCARA, J.B, GRUMMER, R.R. Reduction of plasma NEFA concentrations by nicotinic acid enhances the response to insulin in feed-restricted Holstein cows. **J Dairy Sci**, v. 90 4635–4642. 2007.

PUTNAM, D. E., VARGA, G. A., DANN, H. M. Metabolic and production responses to dietary protein and exogenous somatotropin in late gestation dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 82, 982-995. 1999.

RIVERA, G. M., FORTUNE, J. E. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. **Endocrinology**, v. 144(7), 2977-2987. 2003.

ROCHE, J. R., BERRY, D.P., LEE, J.M., MACDONALD, K.A., BOSTON. R.C., Describing the body condition score change between successive calvings: A novel strategy generalizable to diverse cohorts. **J Dairy Sci**. 90, 4378–4396. 2007.

ROCHE, J. R., D. BLACHE, D., KAY, J.K., MILLER, D.R., SHEAHAN, A.J., D. MILLER. W. Neuroendocrine and physiological regulation of intake, with particular reference to domesticated ruminant animals. **Nutr Res Rev**, v. 21 207–234. 2008.

SCHNEIDER, A., SCHWEGLER, E., MONTAGNER, P., HAX, L.T., SCHMITT, E., PFEIFER, L.F.M., DEL PINO, F.A.B., BIANCHI, I., PALUDO, G.R., CORRÊA M.N., Effect of prepartum somatotropin injection in late-pregnant Holstein heifers on metabolism, milk production and postpartum resumption of ovulation. **Animal**. doi:10.1017/S1751731111002321 in press. 2011.

SHINGU, H., HODATE, K., KUSHIBIKI, S., TOUNO, E., OSHIBE, A., UEDA, Y., SHINODA, M., OHASHI, S. Effects of growth hormone-releasing hormone treatment on milk production and plasma hormones and metabolites in lactating Japanese Black cows under negative energy balance. **J AnimSci**, v. 87, 1247 – 1253. 2008.

STELWAGEN, K., GRIEVE, D.G., MCBRIDE, B.W., REHMAN, J.D. Growth and subsequent lactation in primigravid Holstein heifers after prepartum bovine somatotropin treatment. **J Dairy Sci** 75, 463-471. 1992.

TREACHER, R.J., REID, I.M., ROBERTS, C.J. Effect of body condition at calving on the health and performance of dairy cows. **Anim Prod**, 43: 1- 6 1986.

THATCHER, W. W., WILCOX, C. J. Postpartum estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow. **J Dairy Sci**, v. 56(5), 608-610. 1973.

VELAZQUEZ, M. A., NEWMAN, M., CRIPPS, M. F. P., CROWE, M. A., SMITH, R. F., DOBSON, H. The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. **Theriogenology**, v. 64(9), 1977-1994. 2005.

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

YIMAZ, A., DAVIS, M. E., SIMMEN, R. C. M. Analysis of female reproductive traits in Angus beef cattle divergently selected for blood serum insulin-like growth factor I concentration. **Theriogenology**, v. 65(6), 1180-1190. 2006.