



## DESEMPENHO REPRODUTIVO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE NOVILHAS CRUZADAS (NELORE X RED ANGUS), SUBMETIDAS À INCLUSÃO DE IONÓFOROS NA DIETA

*Lisiane Zaniboni<sup>1</sup>; Antônio Hugo Bezerra Colombo<sup>1</sup>; Aline Bravo de Souza<sup>1</sup>; Marcelo Akimoto<sup>1</sup>; Fábio Luiz Bim Cavalieri<sup>2</sup>; Luiz Paulo Rigolon<sup>3</sup>; Milena Brandão Seko<sup>4</sup>; José Maurício Gonçalves dos Santos<sup>55</sup>*

**RESUMO:** A utilização de ionóforos na alimentação de bovinos e seus principais efeitos têm sido amplamente estudada atualmente. Ionóforos são componentes que quando presentes no rúmen alteram a flora possibilitando um melhor aproveitamento dos nutrientes e assim influenciando em outros sistemas do organismo animal, inclusive o sistema reprodutivo. A pesquisa foi realizada no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, no período de julho de 2011 à junho de 2012. Foram utilizadas 17 novilhas cruzadas com idade média de 20 meses. Elas foram alocadas ao acaso nos diferentes tratamentos: grupo controle, grupo lasalocida e grupo virginiamicina. Associado, foi fornecida uma suplementação com aveia, núcleo, calcário e milho moído para suprir as necessidades dos animais. Ao final do experimento foi realizada a superovulação nos animais, após seis dias a punção folicular guiada por ultrassonografia sendo o conteúdo encaminhado ao laboratório para realizar a produção *in vitro* dos embriões. Todas as variáveis foram analisadas pelo procedimento PROC GENMOD do programa estatístico SAS. Como resultados, obteve-se que a quantidade de oócitos totais, oócitos degenerados, oócitos viáveis, embrião do dia 7 e dia 10 após aspiração apresentaram diferença significativa ( $P < 0.0001$ ) no tratamento 2 comparando-se com os tratamentos 1 e 3. Já o coeficiente de porcentagem das variáveis de embrião do dia 7 e do dia 10 após aspiração, não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos 1, 2 e 3. Obteve-se um melhor desempenho reprodutivo no grupo da lasalocida, provavelmente devido à melhora nutricional.

**PALAVRAS CHAVES:** virginiamicina, lasalocida, fecundação, eclosão e cultivo.

### 1 INTRODUÇÃO

O uso de pastagens anuais de inverno no sul do Brasil, quando manejadas e fertilizadas adequadamente, tem resultado em altos ganhos médios diários (RESTLE et al., 1993, RESTLE et al., 1998). Porém, devido aos altos custos dessas pastagens buscam-se formas de utilizá-las de uma forma mais eficiente (RESTLE et al., 1998). A nutrição pode influenciar a função ovariana por modular principalmente a secreção do LH

<sup>1</sup> Acadêmicos do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – Paraná. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq-Cesumar). [lisinha\\_boni@hotmail.com](mailto:lisinha_boni@hotmail.com); [antoniohugo\\_bezerracolombo@hotmail.com](mailto:antoniohugo_bezerracolombo@hotmail.com); [alinetertuliano@hotmail.com](mailto:alinetertuliano@hotmail.com); [marcelo\\_akimoto@hotmail.com](mailto:marcelo_akimoto@hotmail.com)

<sup>2</sup> Orientador, Docente Doutor do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá -PR. [fabin\\_r@hotmail.com](mailto:fabin_r@hotmail.com)

<sup>3</sup> Coorientador, Doutor, Pesquisador do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. [rigolon@wnet.com.br](mailto:rigolon@wnet.com.br)

<sup>4</sup> Pesquisadora colaboradora do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. [milaseko@hotmail.com](mailto:milaseko@hotmail.com)

<sup>5</sup> Pesquisador colaborador, Docente do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. [jmgds@hotmail.com](mailto:jmgds@hotmail.com)



(menor intensidade do FSH), tanto em condições de alta quanto de baixa ingestão alimentar (SOUZA & CANISSO, 2009).

Várias pesquisas como a de Souza et al. (2009), tem observado que o manejo nutricional é o que tem maior impacto sobre o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas. A insuficiente ingestão de energia está correlacionada com o reduzido desempenho reprodutivo (SANTOS e AMSTALDEN, 1998). Entre os efeitos da nutrição na reprodução, o balanço energético negativo pode ser considerado um fator importante relacionado à baixa função reprodutiva da vaca (BUTLER, 2005)

Segundo Figueiredo et al. (2008), é importante conhecer como os nutrientes são priorizados e utilizados pelo animal. O que permitiria o estabelecimento de métodos nutricionais objetivando o aumento da eficiência reprodutiva. Segundo O'Callaghan & Boland (1999) o "status" nutricional é o maior fator controlador da fertilidade em bovinos. A suplementação para animais mantidos em pastagem de inverno possibilita um melhor balanceamento de nutrientes na dieta de bovinos (RESTLES, J. et al., 1999). Uma alternativa de suplementação é a utilização de ionóforos como a lasalocida e a virginiamicina.

Dentre os ionóforos conhecidos, cerca de 120 formas naturais (NAGARAIA et al., 1997), os mais inseridos na alimentação de bovinos são a monensina, lasalocida, salinomina e a narasina (RODRIGUES, 2000). Segundo Gonçalves & Borges et al., 2009, ionóforos são antibióticos coccidiostáticos constituídos de poliésteres carboxílicos produzidos por várias cepas de *Streptomyces* sp, que aumentam a eficiência alimentar através da alteração seletiva dos padrões de fermentação ruminal.

Seu modo de atuação ocorre através da interferência no fluxo iônico normal e na dissipação do gradiente de prótons e cátions através da membrana dos microrganismos (GONÇALVES & BORGES, 2009). Com isso, há uma ação seletiva sobre as bactérias, de forma que as Gram negativas sobrevivem (RODRIGUES, 2000), que são as bactérias produtoras de hidrogênio, formato, acetato, butirato, lactato e amônia, mas as produtoras de succinato e propionato, bem como os organismos utilizadores de lactato (RUSSELL & STROBEL, 1988). Causando um aumento a concentração de propionato ruminal, sem alterar as concentrações totais de AGV, que resultam num aumento nos níveis de glicose (BAGG, 1997).



Este aumento nos níveis de glicose circulante para o animal e, conseqüentemente, de insulina sanguínea, representa um maior aporte energético, obtendo assim um melhor desempenho reprodutivo (FRANCO et al., 2004). Insulina atua na reprodução por regular a síntese de neurotransmissores de GnRH, conseqüentemente, controla a liberação de LH pela hipófise (KAWAUCHI & SOWER, 2006). A insulina se liga ao seu receptor resultando, principalmente, na estimulação do transporte de glicose para dentro das células, usada como a principal fonte energética para o ovário (LAWRENCE et al., 2007).

Este trabalho foi conduzido com objetivo de determinar a influência da adição de lasalocida e virginamicina na alimentação de novilhas de corte mantidas em pastejo contínuo e suplementação necessária, sobre a eficiência alimentar e, conseqüentemente, na reprodução.

## 2 JUSTIFICATIVA

O uso de suplementação no período das secas garante um aumento nos níveis nutricionais das plantas forrageiras. Assim, este projeto visa contribuir para melhoria na eficiência reprodutiva através da identificação de estratégias nutricionais que aumentem o desempenho animal.

## 3 OBJETIVO

- Avaliar os efeitos do uso da lasalocida e da virginamicina associados a suplementação para novilhas no período da seca;
- Analisar os efeitos dos ionóforos sobre a eficiência reprodutiva;
- Analisar os efeitos dos ionóforos sobre a produção de embriões in vitro de embriões.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 LOCAL



O experimento a pasto foi realizado no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal – BIOTEC e os embriões foram produzidos no Laboratório BIO Biotecnologia Animal também localizado no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal – BIOTEC – CESUMAR.

## 4.2 PERÍODO

O experimento foi realizado no período de julho de 2011 a junho de 2012.

## 4.3 ANIMAIS

Foram utilizadas 20 novilhas cruzadas (nelore x red angus,) com idade média de 20 meses. Todos os animais foram everminados e banhados contra ectoparasitas no início do experimento. As novilhas foram alocadas ao acaso e identificadas por brincos de diferentes cores de acordo com o tratamento.

## 4.4 TRATAMENTOS

Os animais foram divididos em três tratamentos sendo o controle com seis animais (tratamento 1), recebendo suplementação de lasalocida com cinco animais (tratamento 2) e o recebendo suplementação de virginiamicina com seis animais (tratamento 3). Estes aditivos foram fornecidos duas vezes ao dia. No início do experimento foi realizado o período de adaptação, onde a suplementação foi fornecida gradativamente até atingir os teores adequados para cada animal.

Como o pasto não conseguia suprir as necessidades dos animais, junto ao aditivo foi fornecido uma suplementação nos três tratamentos. Esta se baseava por animal em 7kg de aveia, núcleo (50gr de sal mineral, 3gr de adsorvente e o aditivo – no tratamento 2



foi 3gr de lasalocida e no tratamento 3 foi 2gr de virginiamicina), 50gr de calcário e 100gr de milho moído.

Após três meses de suplementação a pasto, os animais foram submetidas a sincronização via hormonal. Esta se baseou em uma aplicação de um implante intravaginal, de 2mL de prostaglandina via subcutâneo e 1mL de benzoato de estradiol via subcutâneo. Prosseguiu-se 6 dias e realizou a aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU – ovum pick up) por animal.

#### 4.5 PUNÇÃO FOLICULAR (OVUM PICK UP - OPU)

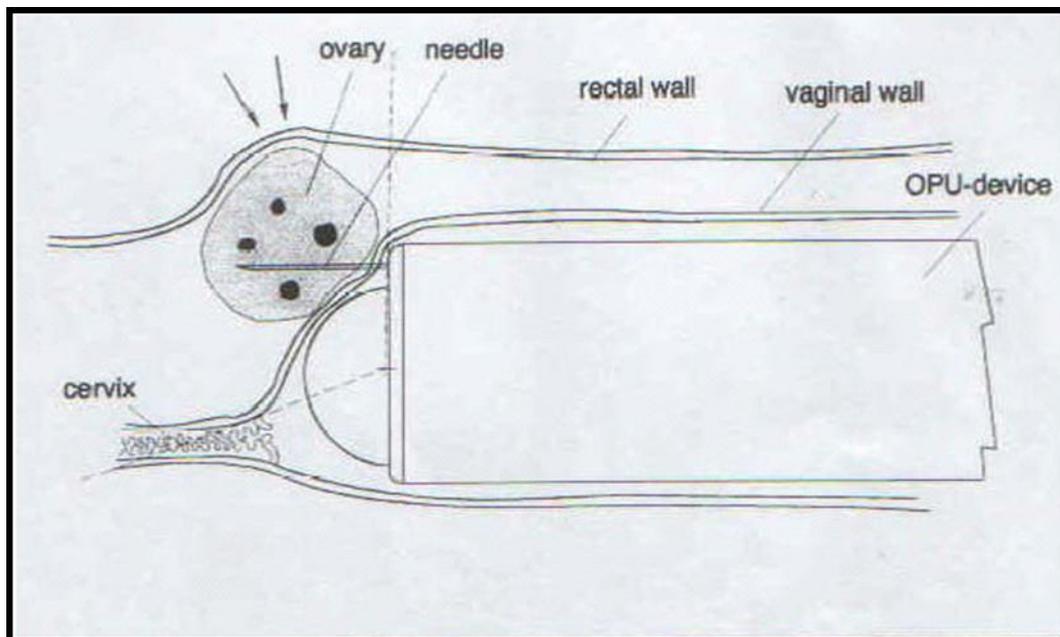
A punção foi realizada com uma agulha acoplada a uma bomba de vácuo guiada por ultrassonografia transvaginal. A fêmea foi colocada no tronco de contenção, onde primeiro foi feita a palpação transretal com esvaziamento do reto e com o auxílio do ultrassom a avaliação dos ovários quanto à população folicular disponível para a aspiração.

Logo após a avaliação, foi realizada uma anestesia epidural baixa com infiltração de 100mg de Cloridrato de lidocaína 2% (Lidovet®, Bravet, Brasil) no espaço sacro coccígeo, após prévia antissepsia com álcool 70°. Também a limpeza da vulva com água e detergente, posteriormente procede-se antissepsia com álcool 70%. Para a coleta do conteúdo folicular foi utilizado um tubo cônico de polipropileno de 50 mL (Corning®, USA) contendo 10mL de solução de punção (2,0% de soro fetal bovino, 98,0% de solução salina fosfatada tamponada e 25 UI/ mL de heparina sódica usada para evitar a coagulação sanguínea no interior do sistema de aspiração), a temperatura de 36°C. O tubo de coleta foi acoplado a Bomba de Vácuo (WTA® 3D-003, Brasil), programada a uma pressão de 38 a 45mmHg (permitindo um fluxo de 12mL de meio/minuto) e ao sistema de punção. O sistema de punção era composto por uma guia transvaginal acoplada a um mandril, onde introduz-se uma agulha 20G (WTA®); e o transdutor microconvexo de 5Mhz, ligado ao aparelho de ultrassom (Aloka® SSD-500, Japão).

O transdutor foi inserido na vagina da fêmea, auxiliado pela abertura dos lábios vulvares. Em seguida, posiciona-se o ovário a frente da sonda com o auxílio da palpação transretal (Figura 1). Quando a imagem do folículo apresentou-se alinhada a linha de punção no monitor do ultrassom, a agulha de aspiração foi introduzida através da parede



vaginal no folículo ovariano, e seu conteúdo aspirado. O mesmo procedimento foi repetido em todos os folículos visíveis de cada ovário.



**Figura 1** - Esquema do posicionamento do ovário na linha de aspiração.

Terminada a punção o sistema foi lavado com meio de punção, o tubo etiquetado e encaminhado ao laboratório para a realização da contagem do número de oócitos recuperados e seleção dos oócitos viáveis.

#### 4.6 SELEÇÃO DOS OÓCITOS VIÁVEIS

No laboratório o conteúdo folicular foi filtrado em coletor de embrião de 70 micra. Após a transferência do conteúdo folicular para o coletor, o tubo de colheita foi lavado com mais 50 mL de PBS (DMPBS® FLUSH, Nutricell, Campinas) à 35°C e novamente depositado no coletor. Então o conteúdo do filtrado foi colocado em uma placa de Petri de 100X 15mm de fundo quadriculado.

Para rastrear os oócitos da placa foi usada uma lupa com um aumento de 80 vezes. A transferência dos oócitos foi feita com a auxílio de uma micropipeta de 20µL e ponteira estéril. As placas foram rastreadas no mínimo duas vezes, os oócitos foram



retirados e acondicionadas em outra placa de Petri 100X15mm, contendo 4 a 5 gotas de meio de Lavagem e/ou Bancada. O meio de bancada era constituído de meio para cultivo celular TCM-199 acrescido de piruvato, antioxidante e soro fetal bovino. Os oócitos foram classificados conforme os critérios propostos por Leibfried e First, 1979 (Gonçalves et al, 2008). Apenas os oócitos grau 1 e 2 são viáveis para maturação *in vitro* (MIV).

#### 4.7 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

No laboratório todos os procedimentos como o preparo de meios, manipulação de oócitos e embriões foram realizados dentro da capela de fluxo laminar. Todos os materiais da rotina laboratorial foram estéreis e descartáveis, tais como placas de Petri, tubos de polipropileno, ponteiras, pipetas e microtubos.

#### 4.8 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

No laboratório os oócitos foram lavados três vezes em meio de Maturação TCM-199 com sais de Earles, glutamina e  $\text{NaHCO}_3$ , suplementado com 10% de soro fetal bovino, 22  $\mu\text{g/mL}$  piruvato, 50 $\mu\text{g/mL}$  de gentamicina, 0,5  $\mu\text{g}$  de FSH/mL, 50  $\mu\text{g}$  de LH/mL e 1  $\mu\text{g}$  de estradiol/mL. Mantidos em incubadora, a 38,5°C, 5% de  $\text{CO}_2$  em ar e com máxima umidade, por um período de vinte e quatro horas. Durante esse período os complexos cumulus oócitos (CCOs) permaneceram em microgotas de 70 $\mu\text{l}$  de meio de maturação coberta por óleo mineral.

#### 4.9 FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

Seguidas as vinte e quatro horas, os oócitos maturados foram lavados três vezes em 100  $\mu\text{l}$  de meio TALP-FIV suplementado com 10 $\mu\text{g/mL}$  de heparina, 22 $\mu\text{l/mL}$  de piruvato, 50 $\mu\text{g/mL}$  de gentamicina, albumina sérica bovina - BSA (sem ácidos graxos), solução de PHE (2 $\mu\text{M}$  de penicilina, 1 $\mu\text{M}$  de hipotaurina e 0,25 $\mu\text{M}$  de epinefrina). Foi utilizado sêmen de uma mesma partida de um touro da raça Nelore, descongelado em



banho-maria a 35°C. Para seleção dos espermatozoides móveis e remoção de diluidores e plasma seminal, foi realizado centrifugação em gradiente Percoll 90% e 45%, a 10.000 rotações por minuto, durante 3 minutos, utilizando-se microtubo de centrífuga de 1,5mL. Foi utilizada a concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozóides/mL, sendo que cada microgota (10 CCOs/gota) receberá 2,5µL. As placas permaneceram em incubadora por até vinte e quatro horas, a 38,5°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e máxima umidade.

#### 4.10 CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

Decorrido 24 horas da fertilização, os zigotos foram cultivados *in vitro* no meio SOF suplementado com 10% de soro fetal bovino, em incubadora, com atmosfera gasosa contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar, com máxima umidade. Após 48 horas, foi avaliada a taxa de clivagem e feito a renovação do meio de cultivo. No 7º dia de cultivo, foi realizada as avaliações dos embriões de cada grupo (blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido), utilizando para tal a classificação dos embriões de cada grupo segundo Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS).

Após 10 dias da fecundação, os embriões foram novamente analisados para a avaliação da taxa de blastocistos eclodidos.

#### 4.11 VARIÁVEIS ESTUDADAS

- Número de oócitos recuperados;
- Número de oócitos viáveis;
- Número de estruturas clivadas;
- Taxa de blastocistos em dia 07 (pós fecundação);
- Taxa de blastocistos eclodidos em dia 10 (pós fecundação).

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA



As variáveis foram analisadas pelo procedimento PROC GENMOD do programa estatístico SAS (2000), versão 8.01, utilizando-se distribuição de poisson e função de ligação identidade.

O modelo matemático será:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ijk}$$

Em que:

$Y_{ijk}$  = observação feita no indivíduo  $j$  submetido ao tratamento  $i$  ( $i=1,2,3$ )

$\mu$  = média geral associada a cada observação;

$T_i$  = efeito do tratamento  $i$  ( $i= 1,2,3$ );

$e_{ijk}$  = erro aleatório associado a cada observação.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à quantidade de oócitos totais, oócitos degenerados, oócitos viáveis, embrião do dia 7 após aspiração, embrião do dia 10 após aspiração e as porcentagens de embrião no dia 7 e dia 10 após aspiração estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Classificação da produção de embriões *in vitro* de novilhas cruzadas após tratamento com aditivos (lasalocida e virginiamicina)<sup>1</sup>.

	Tratamentos <sup>2</sup>		
	1 – controle	2 - lasalocida	3 – virginiamicina
Oócitos totais	10,43 ± 1,22 b	29,17 ± 2,20 a	13,57 ± 1,39 b
Oócitos deg. <sup>3</sup>	4,29 ± 0,78 b	11,17 ± 1,36 a	2,43 ± 0,59 b
Oócitos viáveis	6,14 ± 0,94 b	18,00 ± 1,73 a	11,14 ± 1,26 b
Embrião 7 dias <sup>4</sup>	2,86 ± 0,64 b	5,67 ± 0,97 a	2,29 ± 0,57 b
Embrião 10 dias <sup>5</sup>	2,29 ± 0,57 b	5,50 ± 0,96 a	2,57 ± 0,61 b
%embrião 7 dias <sup>6</sup>	47 ± 0,24 a	32 ± 0,25 a	21 ± 0,16 a
%embrião 10 dias <sup>7</sup>	37 ± 0,22 a	31 ± 0,35 a	23 ± 0,18 a

<sup>1</sup> Média ± erro padrão. <sup>2</sup> Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ( $P \leq 0,05$ ). <sup>3</sup> Oócitos degenerados. <sup>4</sup> Número de embriões após 7 dias da aspiração em meio de cultivo adequado. <sup>5</sup> Número de embriões após 10 dias da aspiração em meio de cultivo adequado. <sup>6</sup> Porcentagem de embriões após 7 dias da aspiração em meio de cultivo adequado. <sup>7</sup> Porcentagem de embriões após 10 dias da aspiração em meio de cultivo adequado.



Nos testes realizados avaliando a quantidade de oócitos totais, oócitos degenerados e oócitos viáveis, apresentaram diferença significativa ( $P < 0.0001$ ) no tratamento 2 comparando-se com os tratamento 1 e 3. O embrião do dia 7 após aspiração, apresentou diferença significativa ( $P = 0.0041$ ) no tratamento 2 comparando-se com os tratamento 1 e 3. O embrião do dia 10 após aspiração, apresentou diferença significativa ( $P = 0.0041$ ) no tratamento 2 comparando-se com os tratamento 1 e 3.

Com relação ao coeficiente de porcentagem das variáveis de embrião do dia 7 após aspiração e do embrião do dia 10 após aspiração, não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos 1, 2 e 3.

Resultados positivos observados pelo aumento no nível de glicose e, conseqüentemente, de insulina que melhoram o ganho de peso médio diário e em conjunto o potencial reprodutivo de novilhas. Franco et al. (2004), observou que o aumentando da glicose circulante e, conseqüentemente, a insulina sanguínea, é um fator importante para a reprodução.

Como já citado, o propionato, produzido com o uso de ionóforos, eleva a glicose sanguínea e a concentração de insulina aumentando a retenção de energia pelo organismo (REYNOLDS et al., 1991), observando o aumento no ganho de peso médio diário. O que pode ser observado na pesquisa do Oliver (1975) que obteve ganhos diários superiores quando os animais recebiam lasalocida.

Pesquisas como Roso (2001), testando lasalocida sódica suplementada via sal, para fêmeas de corte mantidas em pastagens cultivadas com gramíneas anuais, obteve incremento no ganho de peso/ha. Lucas & Sobrinho (1989) observaram ganho de peso 10% superior (0,727 kg/ animal/dia vs. 0,805 kg/animal/dia) em machos mestiços castrados (316 kg), pastejando capim-colonião cv.

No entanto, Utley et al. (1978) e Restle et al. (1997) suplementando respectivamente, monensina e lasalocida para animais mantidos em pastagem, não verificaram efeito positivo no ganho de peso. Prohmann et al., (2004) testando a suplementação com lasalocida, em novilhos inteiros de nove meses de idade permanecendo em pastagens de coastcross e aveia, não observou incremento no desempenho dos animais.



Parigini-Bini (1979) pesquisou o efeito do uso da virginiamicina em ruminantes verificando aumento de ganho de peso e na eficiência alimentar. E Restle et al. (1997) não encontrou diferenças no ganho de peso de novilhas em recria ao receberem lasalocida sódica misturada ao sal comum. Resultados contrários aos observados neste trabalho, já que o uso da virginiamicina para novilhas Nelore não influenciou no ganho de peso e nem no aumento da eficiência reprodutiva, observado na Tabela 1.

Existem receptores para insulina na hipófise (LESNIAK et al., 1988) e no tecido ovariano (PORETSKY & KALIN, 1987), para realizar estimulação da liberação de GnRH no hipotálamo quanto tem glicose disponível (ARIAS et al., 1992). E ela também estimula a produção de estradiol pelas células ovarianas de vacas (SPICER & ECHTERNKAMP, 1995) e ainda pode influenciar a taxa de ovulação (HARISON & RANDEL, 1986).

Rhodes et al. (1995) demonstraram que o diâmetro do folículo dominante possui correlação negativa com perda de peso, e em gado de leite períodos de balanço energético negativo (BEN) influenciam negativamente o crescimento folicular (BEAM & BUTLER, 1999).

## 6 CONCLUSÃO

A relação entre nutrição e reprodução é um assunto de muita importância na produção animal, que merece ênfase para se conquistar maiores índices na pecuária de corte do país.

Uma alternativa é a suplementação com ionóforos, que agem de forma seletiva favorecendo o crescimento de bactéria gram-negativo que são as produtoras de proprionato que vai aumentar os níveis de glicose e insulina sanguínea, o que representa um maior aporte energético, obtendo assim um melhor desempenho reprodutivo.

O uso da lasalocida, embora não tenha afetado na porcentagem de embrião no cultivo após sete e dez dias, resultou em incremento no número de oócitos recuperados.

Contudo, é necessário a realização de mais pesquisas relacionadas ao uso da suplementação com ionóforos, principalmente a lasalocida e a virginiamicina para definir os resultados reais acarretados pelos mesmos.



## REFERÊNCIAS

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

BAGG, R. Mode of action of ionophores in lactation dairy cattle. In: USEFULNESS OF IONOPHORES IN LACTATING DAIRY CATTLE. SYMPOSIUM, 1997, Guelph. Proceedings. **Guelph: Ontario Veterinary College**, 1997. p.13-21.

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

BUTLER, W.R. Inhibition of ovulation in the postpartum cow and the lactating sow. **Livest Prod Sci**, v.98, p.5-12, 2005.

FRANCO, G. L.; ALVES, J. M.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; GAMBARINI, M. L. Interação entre nutrição e reprodução em vacas de corte. **Revista CFMV**, Brasília, n.32, p. 23-32, 2004.

FIGUEIREDO, D. M.; PAULINO, M. F.; DETMANN, E.; SOUZA, M. G.; COUTO, V. R. M.; SALES, M. F. L. Estratégias de suplementação para antecipação da idade à puberdade para novilhas de corte em pastagem tropical. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 30, n. 4, p. 415-423, 2008.

GONÇALVES, L.B.; BORGES, I.; FERREIRA, P.D.S. Alimentação de gado de leite. Belo Horizonte. **FEPMVZ** – Editora, 412 p. 2009.

HARRISON, L.M.; RANDEL, R.D. Influence of insulin and intake on ovulation rate, luteinizing hormone and progesterone in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v.63, p.1228-1235, 1986.

KAWAUCHI, H.; SOWER, S.A. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. **Gen Comp Endocrinol**, v.148, p.3-14, 2006.

LAWENCE, M.C.; MCKERN, N.M.; WARD, C.W. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. **Curr Opin Struct Biol**, v.17, p.699-705, 2007.

LESNIAK, M.A.; HILL, J.M.; KIESS, W.; ROJESKI, M.; PERT, C.B.; ROTH, J. Receptors for insulin-like growth factors I and II. Autoradiographic localization in rat brain and comparison to receptors for insulin. **Endocrinology**, v.123, p.2089-2099, 1988.

LUCAS, M. J.; SOBRINHO, E. **Efeito do uso de Virginiamicina sobre o desempenho de bovinos em pastagens**. [S.l.: s.n.], 1989. 2 p.



NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; VAN NEVEL, C.J. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. **Rumen microbial ecosystem**. 2.ed. London: Chapman & Hall, 1997. p.523-632.

OLIVER, W.M. Effect of rumensin on gain of steers grazed on Coastal bermudagrass. **Journal of Animal Science**. V. 40, p. 190 (Abstr.), 1975.

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

PARIGI-BINI, R. Researches on virginiamycin supplementation of feeds used in intensive cattle management. **Performance in Animal Production**, Smith Kline, Milan, p.237-50, 1979.

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

PROHMANN, P.E.F.; BRANCO, A.F.; CECATO, E.M. Suplementação de Bovinos em Pastagens de Coastcross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers) no Inverno. In: **Revista Brasileira de Zootecnia**, 33, n.4, p. 801-810, 2004.

RESTLE, J.; LUPATINI, G.C.; ROSO, C. et al. Eficiência e desempenho de diferentes categorias de bovinos de corte em pastagem cultivada. **Revista Brasileira de Zootecnia**., Viçosa, v. 27, n. 2, p. 397-404, 1998.

RESTLE, J.; LUPATINI, G.C.; VALENTE, A.V. et al. Avaliação da mistura de aveia preta (*Avena strigosa*) e azevém (*Lolium multiflorum*) sob pastejo submetida a níveis de nitrogênio. I - Produção animal. In.: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, Rio de Janeiro. Anais... Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, p. 283. 1993.

RESTLE, J.; ROSO, C.; SOARES, A.B. Lasalocida sódica suplementada via sal para fêmeas de corte mantidas em pastagem. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 34, 1997, Juiz de Fora. Anais... Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1997. p. 179-181.

RESTLE, J.; ROSO, C.; SOARES, A.B. Lasalocida sódica suplementada via sal para fêmeas de corte mantida em pastagem cultivada de estação fria. **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DA ZOOTECNIA**. Juiz de Fora, p.268-270, 1997.

RESTLES, J.; SOARES, A.B.; FERREIRA, M.V.B.; BRONDANI, I.L.; CALÇA, K.G. Suplementação Associada com Lasalocida para Novilhos em Terminação em Pastagem Cultivada de Inverno. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 555-559, 1999.

REYNOLDS, C.K.; TYRRELL, H.F.; REYNOLDS, P.J. Effects of dietary forage-to-concentrate ratio and intake on energy metabolism in growth beef heifers: net nutrient metabolism by visceral tissues. **Journal of Nutrition**, v.121, p. 994-1003, 1991.



RHODES, F.M.; FITZPATRICK, L.A.; ENTWISTE, K.W.; DE'ATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. **Journal of Reproduction Fertility**, v.104, p.41-49, 1995.

RODRIGUES, P.H.M. Efeitos dos níveis de monensina e proporções volumosos/concentrados na ração sobre a utilização dos alimentos e parâmetros da fermentação ruminal em animais ruminantes. **Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba**. 2000. 169f.

ROSO, C.; RESTLE, J. Lasalocida Sódica Suplementada Via Sal para Fêmeas de Corte Mantidas em Pastagem Cultivada de Estação Fria. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 801-810, 2001.

RUSSEL, J.B.; STROBEL, H.J. Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. **J. Anim. Sci.**, v.66, p.552-558, 1988.

SANTOS, J.E.P.; AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. XIII **Reunião Anual SBTE. Atibaia**, SP. In Arq. Fac. Vet. UFRGS. Porto Alegre, RS. 26(1): 19-89, 1998.

SOUZA, F.A.; CASSINO, I.F.; BORGES, A.M.; FILHO, V.R.V.; LIMA, A.L.; SILVA, E.C. Restrição alimentar e os mecanismos endócrinos associados ao desenvolvimento folicular ovariano em vacas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.61-65, abr./jun. 2009.

SOUZA, F.A.; CANISSO, I.F.; VALENTE, A.V. et al. Restrição alimentar e os mecanismos endócrinos associados ao desenvolvimento folicular ovariano em vacas. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.61-65, abr./jun. 2009.

SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, p.223-245, 1995.

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS. Versão 8.0. Cary, NC: 2000. (**Manual Online**)

UTLEY, P.R.; NEVILLE Jr, W.E.; MCCORMICK, W.C. Monensin fortified corn supplements in combination with testosterone-estradiol implants and vaginal devices for finishing heifers on pasture. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 47, n. 6, p. 1239-1242. 1978.