

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**TAXA DE CONCEPÇÃO DE VACAS EM LACTAÇÃO  
SUBMETIDAS À IATF UTILIZANDO DISPOSITIVOS  
INTRAVAGINAIS COM 1,0 e 1,3 g DE PROGESTERONA**

**Marco Antonio Ruiz Lopes**  
Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP  
2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**TAXA DE CONCEPÇÃO DE VACAS EM LACTAÇÃO**  
**SUBMETIDAS À IATF UTILIZANDO DISPOSITIVOS**  
**INTRAVAGINAIS COM 1,0 e 1,3 g DE PROGESTERONA**

Marco Antonio Ruiz Lopes  
Orientador: Prof. Adj. Guilherme de Paula Nogueira

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Campus de Araçatuba/SP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP  
2015

**Catálogo na Publicação (CIP)**

**Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP**

Lopes, Marco Antonio Ruiz

L864t taxa de concepção de vacas em lactação submetidas à IATF utilizando dispositivos intravaginais com 1,0 e 1,3g de progesterona / Marco Antonio Ruiz Lopes. -- Araçatuba: [s.n], 2015.  
75 f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2015.

Orientador: Prof. Adj. Guilherme de Paula Nogueira

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** Taxa de concepção de vacas em lactação submetidas à IATF utilizando dispositivos intravaginais com 1,0 ou 1,3 gramas de progesterona.

**AUTOR:** MARCO ANTONIO RUIZ LOPES

**ORIENTADOR:** Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.



Dr. DANIEL DE JESUS CARDOSO DE OLIVEIRA

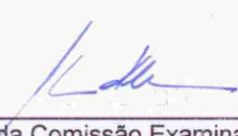


Dra. CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE



Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

**DATA DA REALIZAÇÃO:** 19 de janeiro de 2015.



---

Presidente da Comissão Examinadora  
Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA  
- Orientador -

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MARCO ANTONIO RUIZ LOPES**- nascido em 13 de junho de 1977, no município de Guarulhos – SP. É médico veterinário formado pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/SP (2001). Trabalhou na área comercial de fármacos e minerais para bovinos, de janeiro a agosto de 2002 pela empresa Minerthal e a partir desta data passou a desenvolver trabalhos técnicos a campo para bovinos de leite e corte nas áreas de reprodução, gestão, sanidade, clínica e cirurgia na região de Araçatuba/SP e no estado do Mato Grosso do Sul. Ingressou no mestrado em agosto de 2012, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba no programa em Ciência Animal, na área de concentração Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal.

**O comando demonstra os atributos do general quanto à sabedoria, sinceridade, humanidade, coragem e exigência. Se for sábio, um comandante é capaz de reconhecer quando uma situação muda e, em consequência, reagir rapidamente. Se for sincero, seus homens acreditarão em suas recompensas e castigos. Se for humano, amará a humanidade, simpatizará com os outros e saberá apreciar-lhes o engenho e o esforço. Se for corajoso, alcançará a vitória agarrando-se as oportunidades sem hesitação. Se for exigente, suas tropas serão disciplinadas, respeitando-o e temendo-lhe as punições.**

**A Arte da Guerra – Sun Tzu**

**Dedico esta conquista a minha esposa (Gilza) e filha (Maria Eduarda) que durante todo esse período de enriquecimento intelectual e profissional estiveram ao meu lado com paciência e firmeza me apoiando nos momentos mais difíceis.**

**Aos meus pais (Hélio e Deyse) que apesar da distância estiveram torcendo por mim.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA-UNESP) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por me receber e proporcionar a realização desse projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira que acreditou desde o começo na minha pessoa para a execução do projeto.

A equipe de pós-graduandos do Laboratório de Endocrinologia Animal, principalmente aos colegas e amigos, Marcos A. Maioli e David G. Arana que sempre estiveram dispostos a me ajudar quando precisei.

À Devani Mariano Pinheiro, pelo auxílio na realização das análises laboratoriais.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Silvia Helena Venturoli Perri pelo auxílio nas análises estatísticas durante o experimento.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Marion Burrkhardt de Koivisto e Prof<sup>a</sup>. Dra. Flávia Lombardi Lopes por terem participado e acrescentado melhorias ao trabalho durante a banca de qualificação, muito obrigado!

Ao laboratório Biogenesis Bagó pelo fornecimento da linha de hormônios utilizados na execução do projeto.



## SUMARIO

	<b>Página</b>
I INTRODUÇÃO.....	17
II REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Fisiologia reprodutiva em vacas de leite .....	19
2.2 Particularidades da P <sub>4</sub> no ciclo estral de vacas leiteiras .....	20
2.3 Efeito ECC e BEN na concentração de P <sub>4</sub> e E2 .....	21
2.4 Efeito da baixa concentração de P <sub>4</sub> na reprodução de vacas leiteiras .....	23
2.5 Efeito da alta concentração de P <sub>4</sub> na reprodução de vacas leiteiras .....	26
2.6. Fatores externos que contribuem alteram concentrações de P <sub>4</sub> .....	30
III OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral.....	34
IV HIPÓTESE .....	34
V MATERIAL E MÉTODOS .....	35
5.1 Animais: .....	35
5.2 Delineamento experimental: .....	35
5.3 Sincronização do estro e tratamento hormonal: .....	36
5.4 Amostras de soro e análise hormonal.....	36
5.5 Radioimunoensaio .....	37
5.6 Temperatura Ambiente .....	37
5.7 Análise Estatística.....	38
VI RESULTADOS .....	40
6.1 Taxa de concepção em função da concentração de progesterona entre os dispositivos intravaginais (1,0 ou 1,3 g). .....	40
6.2 Concentrações séricas de P <sub>4</sub> no D3 em função do dispositivo intravaginal (1,0 ou 1,3 g) e a presença ou ausência de C.L. ....	41
6.3 Concentrações séricas de P <sub>4</sub> no D3 em função da produção de leite e temperatura ambiente.....	43
6.4 Produção de leite (L) no D0 em função do dispositivo intravaginal (1,0 ou 1,3 g), gestação e temperatura.....	45

6.5 Influência da temperatura na taxa de concepção e na probabilidade de prenhez.....	47
6.6 Dias em lactação em função da gestação e porcentagem acumulativa de prenhez:.....	50
6.7 Diferença entre propriedades: .....	51
VII DISCUSSÃO .....	52
7.1 Taxa de concepção:.....	52
7.2 Concentração sérica de P <sub>4</sub> no D0: .....	52
7.3 Produção de leite (L) no D0: .....	54
7.4 Gonadotrofina coriônica eqüina (eCG): .....	56
7.5 Temperatura ambiente (°C): .....	57
7.6 Dias em lactação: .....	58
VII CONCLUSÃO.....	59
VIII REFERÊNCIAS .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGNE =	Ácidos graxos não esterificados
ANOVA =	Análise de Variância
BEN =	Balanço Energético Negativo
BE =	Benzoato de Estradiol
CV =	Coeficiente de variação
CATI =	Coordenadoria de assistência Técnica Integrada
CL =	Corpo lúteo
D0 =	Dia de início do protocolo de IATF
D3 =	Terceiro dia de protocolo de IATF
D8 =	Oitavo dia de protocolo de IATF
D9 =	Nono dia de protocolo de IATF
D10 =	Décimo dia do protocolo de IATF
DEL =	Dias em lactação
ECC =	Escore de Condição Corporal
eCG =	Gonadotrofina coriônica equina
E2 =	Estradiol
G =	Gramas
GnRH =	Hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG =	Gonadotrofina coriônica humana
IA =	Inseminação artificial
IATF =	Inseminação artificial em tempo fixo
IEP =	Intervalo entre partos
IFN- $\tau$ =	Interferon tau
IGFPB =	Proteína transportadora do fator de crescimento semelhante a Insulina
IM =	Intramuscular
$^{125}\text{I}$ =	Iodo 125
L =	Litros
MHz =	Mega-hertz
mg =	Miligramas

Mm = Milímetros

ng mL<sup>-1</sup> = Nanograma por mililitro

P/IA = Prenhez por inseminação artificial

P<sub>4</sub> = Progesterona

PGF<sub>2α</sub> = Prostaglandina F2-alfa

SAS = Statistical analysis system

X<sup>2</sup> = Qui-quadrado

ZCT = Zona de Conforto Térmico

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1-</b> Diagrama do protocolo de IATF adotado. B.E. - Benzoato de E2; PGF <sub>2α</sub> – prostaglandina F <sub>2α</sub> .....	36
<b>Figura 2-</b> Distribuição de vacas prenhes e não prenhes com dois diferentes dispositivos intravaginais (1,0g e 1,3g) após protocolo de IATF.....	40
<b>Figura 3-</b> Número e proporção de vacas prenhes com dispositivo intravaginal com 1,0g ou 1,3g concentração de progesterona em protocolos de IATF.....	41
<b>Figura 4-</b> Variação na concentração sérica de progesterona (ng ml <sup>-1</sup> ) em vacas leiteiras em lactação no terceiro dia de protocolo de IATF comparando as vacas prenhes com as não prenhes.....	42
<b>Figura 5-</b> Número de vacas prenhes ou não prenhes considerando a presença ( $\geq 2$ ng ml <sup>-1</sup> ) ou ausência de CL (<2ng ml <sup>-1</sup> ) estabelecida em função da concentração de progesterona no D3 do protocolo de sincronização de ovulação.....	42
<b>Figura 6-</b> Correlação entre produção de leite e concentração de progesterona no D3 em todas as vacas (prenhes e não prenhes) de todos os tratamentos.....	43
<b>Figura 7-</b> Correlação entre produção de leite (L) e concentração e progesterona (ng ml <sup>-1</sup> ). (A) vacas não prenhes com dispositivo de 1,0g progesterona; (B) vacas não prenhes com dispositivo de 1,3g progesterona.(C) vacas prenhes com dispositivo de 1,0g progesterona. (D) vacas prenhes com dispositivo de 1,3g progesterona.....	44
<b>Figura 8-</b> Correlação entre temperatura ambiente máxima (°C) e concentração de progesterona (ng ml <sup>-1</sup> ) no terceiro dia de protocolo de IATF em todas as vacas.....	45

<b>Figura 9-</b>	Correlação entre produção de leite (l) no D0 com prenhes (=1) e não prenhes (=0).....	46
<b>Figura 10-</b>	Correlação entre temperatura máxima do ambiente (°C) com produção de leite (L) no dia de início do protocolo (D0) de IATF.....	47
<b>Figura 11-</b>	Datas em que foram realizadas as IATFs e temperatura ambiente (°C) máxima no dia da IATF e média da temperatura máxima durante os 50 dias antes a IATF.....	47
<b>Figura 12-</b>	Distribuição das prenhes (=1) e não prenhes (=0) em função da média da temperatura máxima (°C) durante 50 dias que antecedem o IATF.....	49
<b>Figura 13-</b>	Probabilidade de prenhez em função da média da temperatura ambiente máxima durante o período de 50 dias (período de duração da foliculogênese).....	49
<b>Figura 14-</b>	Dispersão entre dias em lactação (DEL) e diagnóstico de gestação (prenhes=1 e não prenhes=0) em todas as vacas.....	50
<b>Figura 15-</b>	Porcentagem acumulada de vacas prenhes em relação aos dias em lactação.....	50

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1-</b> Média, valor máximo e mínimo da concentração de progesterona no terceiro dia (D3) do protocolo de IATF em vacas leiteiras em lactação.....	41
<b>Tabela 2-</b> Variação na produção de leite (L) no dia inicial do protocolo (D0) de IATF entre as vacas que ficaram prenhes e as que não ficaram e entre as vacas com dispositivos com diferentes concentrações de progesterona.....	46
<b>Tabela 3-</b> Variação na média da temperatura máxima durante o período de foliculogênese (50 dias antes da inseminação) em que foram expostas as vacas que ficaram prenhes e as que não ficaram.....	48
<b>Tabela 4-</b> Distribuição do número e porcentagem de prenhez entre as propriedades utilizadas.....	51

## TAXA DE CONCEPÇÃO DE VACAS EM LACTAÇÃO SUBMETIDAS À IATF UTILIZANDO DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS COM 1,0 e 1,3 g DE PROGESTERONA

**RESUMO** – Comparou-se a taxa de concepção de vacas leiteiras (22,4±5,58L) submetidas à IATF, usando dispositivo intravaginal com diferentes doses de progesterona (P<sub>4</sub>). As vacas foram implantados aleatoriamente com dispositivo de 1,0g (n= 43) ou 1,3g de P<sub>4</sub> (n = 48) em seguida foi administrado 2 mg de benzoato de estradiol (BE, IM). No D3 foi coletado sangue para análise da concentração de P<sub>4</sub>. No D8 retirou-se o implante e administrou-se 0,15 mg de D-Cloprostenol (IM). No D9, foi injetado 1 mg de BE (IM) e aproximadamente 56 h após a retirada do implante realizou-se IATF. Foi coletada temperatura ambiente nos 50 dias que antecederam a inseminação. O diagnóstico de gestação foi realizado com ultrassom após 30 dias da IATF. A taxa de prenhez foi de 19,8%, sendo oito vacas com 1,0g e dez com 1,3g de P<sub>4</sub>. Não houve diferença na taxa de prenhez entre os grupos de P<sub>4</sub> e a presença ou ausência de CL (teste  $\chi^2$ ). A temperatura ambiente máxima nos 50 dias antes da IATF foi maior (ANOVA) no subgrupo não prenhe com 1,3g de P<sub>4</sub> em relação às não prenhes com 1,0g e às prenhes com 1,0 ou 1,3g de P<sub>4</sub>. Para cada aumento de 1°C na média da temperatura ambiente dos 50 dias pré IA a taxa de prenhez diminui 42,1% (análise de regressão logística). Conclui-se que suplementar vaca em lactação (22L) com mais P<sub>4</sub> intravaginal (1 ou 1,3 g) não modificou a taxa de concepção com o protocolo de IATF utilizado sob estas condições ambientais.

**Palavras-Chave:** corpo lúteo, estresse, inseminação, reprodução, temperatura



**CONCEPTION RATE IN LACTATION COWS UNDER TAI PROTOCOL  
USING INTRAVAGINAL DEVICES WITH DIFFERENT PROGESTERONE  
CONCENTRATIONS (1,0 and 1,3g)**

**SUMMARY** - We compared the conception rate of dairy cows ( $22.4 \pm 5,58L$ ) submitted to TAI, using intravaginal device with different doses of progesterone ( $P_4$ ). The cows were randomly implanted with a device of 1.0g ( $n = 43$ ) or 1.3 g  $P_4$  ( $n = 48$ ) was then given 2 mg of estradiol benzoate (EB, MI). In D3 blood was collected for analysis of  $P_4$  concentration. In D8 was removed and the implant was administered 0.15 mg of D-cloprostenol (IM). At D9, was injected 1 mg of EB (MI) and about 56 h after implant removal was performed TAI. Ambient temperature was collected in the 50 days prior to insemination. Pregnancy diagnosis was performed with ultrasound after 30 days of TAI. The pregnancy rate was 19.8%, eight cows with 1.0g and ten with 1.3 g of  $P_4$ . There was no difference in pregnancy rates between  $P_4$  groups and the presence or absence of CL ( $\chi^2$  test). The maximum ambient temperature in the 50 days before IATF was higher (ANOVA) in patients not pregnant with 1.3 g of  $P_4$  in relation to non-pregnant with 1.0g and pregnant with 1.0 or 1.3 g of  $P_4$ . For each increase of  $1^\circ C$  in average ambient temperature of 50 days pre AI pregnancy rate decreases 42.1% (logistic regression analysis). It was concluded that further lactating cow (22L) over intravaginal  $P_4$  (1 or 1.3 g) did not change the design rate with artificial insemination protocol used under these environmental conditions.

**Keywords:** corpus luteum, stress, insemination, reproduction, temperature

## I INTRODUÇÃO

Os primeiros exemplares de bovinos com aptidão leiteira chegaram ao Brasil por volta dos anos de 1530 a 1535, sendo que os registros genealógicos da raça holandesa foram oficializados a partir de 1935. Desde então a produção leiteira vem aumentando e o uso de tecnologias ganhando mais espaço a fim de aumentar a produtividade nacional.

A produção de leite mundial em 2013 alcançou a marca de 556.141 x10<sup>3</sup> toneladas segundo ANUALPEC (2013).

O Brasil ocupa a sexta colocação como produtor mundial de leite com 32.380 x 10<sup>3</sup> toneladas o que representa 5,8% da produção mundial, na última década esse setor mostrou um aumento de 27,9% na produção e 25,7% no número de animais (ANUALPEC, 2013).

A Associação Brasileira de Produtores de Leite, em 2010 (apud Fernandes, 2013) informou que as atividades relacionadas ao leite como produção, industrialização e transporte contabilizou um total de 3,8 milhões de trabalhadores, gerando maior número de empregos do setor privado do Brasil, seguido da construção civil, setor têxtil e metalúrgico.

Um dos pontos chave para o sucesso da atividade leiteira é a eficiência reprodutiva, com o objetivo de uma bezerra (o) por ano, ou seja, um intervalo entre partos (IEP) de 12 meses, além do início de um novo ciclo de lactação (WALSH et al., 2011).

Portanto, uma das bases para a eficiência na produção de leite passa a ser a reprodução. Vacas leiteiras (*Bos taurus*) de boa eficiência reprodutiva devem emprenhar no intervalo de 75 a 85 dias pós parto, dependendo da raça, período este em que a mesma encontra-se em balanço energético negativo (BEN), ou seja, o consumo de alimento passa a ser insuficiente para atender as exigências de manutenção e da elevada produção leiteira (WALSH et al., 2011). Junto a isso verificou-se um declínio na eficiência reprodutiva nos últimos anos (LUCY, 2001; ROYAL et al., 2000; WASHBURN et al., 2002)

Verificou-se que vacas com maior produção de leite ovulam folículos maiores, embora as concentrações circulantes de estrógenos sejam inferiores

(LOPEZ et al., 2004) e, paralelamente apresentam um maior volume de tecido luteal e menor concentração de progesterona ( $P_4$ ) sérica (LOPEZ et al., 2005). O maior consumo de matéria seca pelas vacas em lactação aumenta o fluxo sanguíneo hepático e a metabolização do estrogênio e  $P_4$  em cerca de 2,3 vezes comparado com as vacas não lactantes (SANGSRITAVONG et al., 2002), provocando um declínio nas concentrações sérica de estradiol (E2) e  $P_4$  ao ponto de reduzir a eficiência reprodutiva (WILTBANK et al., 2006).

Reduzidas concentração de  $P_4$  podem comprometer o desenvolvimento folicular. Folículos expostos a reduzidas concentrações de  $P_4$  podem ovular com tamanhos maiores do que o normal e com oócitos que de qualidade inferior por sofrem maturação nuclear precoce, o que pode resultar em perdas embrionárias precoces resultando em uma menor taxa de prenhez por inseminação.

O objetivo desse trabalho foi:

- a) avaliar o efeito dos dispositivos com diferentes concentrações de  $P_4$  em protocolos de IATF;
- b) avaliar outros fatores como a interferência da produção de leite;
- c) concentração sérica de  $P_4$  no terceiro dia de protocolo e;
- d) temperatura ambiental associadas à taxa de prenhez após protocolo de IATF.

Hipotetizou-se que a suplementação de vacas de leite em lactação com dispositivo intravaginal com maior concentração de  $P_4$  (1,0g e 1,3g) aumenta a taxa de concepção.

## **II REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Fisiologia reprodutiva em vacas de leite**

A eficiência reprodutiva é de grande importância econômica para a pecuária leiteira, pois o ciclo de lactação é iniciada e renovada pelo parto (PULEY et al., 2013).

Durante as últimas décadas observou-se a redução da fertilidade (prenhez por inseminação artificial - P/IA), da expressão do estro, e da detecção de estro (LOPEZ et al., 2004; WILTBANK et al., 2006). Em vacas leiteiras de alta produção tais efeitos podem estar associados com alterações na fisiologia reprodutiva. Por exemplo, a duração média do estro é reduzida em vacas em lactação para menos de 8 h (LOPEZ et al., 2004). A taxa de concepção é menor em vacas lactantes (25-40%) quando comparado a novilhas (60-75%) (LUCY, 2001; PURSLEY et al., 1997). A taxa de gemelaridade em vacas leiteiras é maior do que em novilhas (RYAN et al., 1991) e pode ser superior a 20% em alguns rebanhos. A perda da prenhez é maior em vacas em lactação do que novilhas (SANTOS et al., 2004).

Outras anormalidades reprodutivas têm sido relatadas em vacas de leite, tais como alterações no intervalo para a primeira ovulação, luteólise prematura com ciclos estrais curtos, luteólise atrasada ou corpo lúteo (CL) persistente, o desenvolvimento de cistos foliculares e anovulação, bem como as alterações nos padrões de onda folicular ovariano, morfologia, duração do ciclo estral e as concentrações circulantes de hormônios (BUTLER et al., 2001; LOPEZ et al., 2004; LUCY, 2001; OPSOMER et al., 1998; PURSLEY et al., 1997; ROYAL et al., 2000; RYAN et al., 1991; SANTOS et al., 2004; SARTORI et al., 2002; SARTORI et al., 2004; WASHBURN et al., 2002; WILTBANK et al., 2002; YANIZ et al., 2004).

Vacas que foram selecionadas para alta produção de leite em comparação com grupos de menor mérito genético para produção de leite, tiveram um intervalo mais longo a primeira ovulação pós-parto de 14 dias (LUCY, 2001) ou oito dias (GONG et al., 2002) e detecção do primeiro estro pós-parto de 4,5 dias (HAGEMAN et al., 1991).

## 2.2 Particularidades da P<sub>4</sub> no ciclo estral de vacas leiteiras

Vacas leiteiras em lactação têm concentrações séricas de P<sub>4</sub> menor do que novilhas não lactantes (WILTBANK et al., 2000; WOLFENSON et al., 2004). A P<sub>4</sub> é importante para a fertilidade, como demonstrado por uma correlação positiva entre a concentração sérica de P<sub>4</sub> antes da inseminação artificial (IA) e a taxa de concepção subsequente (FONSECA et al., 1983; FOLMAN et al., 1990). A concentração de P<sub>4</sub> durante o desenvolvimento do folículo ovulatório é fundamental para alcançar alta fertilidade em vacas leiteiras (BISINOTTO et al., 2010a).

Durante a fase luteal do ciclo estral de bovinos (período de maior concentração de P<sub>4</sub>) há maior amplitude dos pulsos de LH comparado ao início da fase luteal. Postula-se que as concentrações elevadas de P<sub>4</sub> durante a fase luteal do ciclo estral é o modulador predominante na diminuição na frequência pulsátil de liberação de LH (RAHE et al., 1980). A concentração de P<sub>4</sub> na circulação influencia a frequência com que os pulsos de LH são liberados a partir da pituitária anterior nas fêmeas bovinas (IRELLAND; ROCHE, 1982; ROBERSON et al., 1989). A administração de uma combinação de P<sub>4</sub> e E2 promoveu uma maior supressão da concentração média de LH do que administração de única de E2 em novilhas (BECK et al., 1976).

A P<sub>4</sub> desempenha um papel importante no controle do ciclo estral na pecuária uma vez que inibe a expressão do estro e impede a ovulação pela supressão da liberação de LH. Desde 1960, estudos têm sido feitos para obter uma melhor compreensão dos princípios fisiológicos e bioquímicos que controlam os processos reprodutivos, bem como concentrações circulantes de P<sub>4</sub> (BUTLER, 2003; GOMES; ERB, 1965; MILLER et al., 1963). A concentração de P<sub>4</sub> plasmática é controlada por um conjunto de mecanismos fisiológicos, incluindo a ligação à proteínas do plasma, acumulação em tecido adiposo, absorção em tecidos e órgãos que contêm receptores de P<sub>4</sub>, e excreção (HAMUDIKUWANDA et al., 1996; RABIEE et al., 2001a; WILLIAMS, 1962).

Estudos sobre o uso de P<sub>4</sub> via administração parenteral e intravaginal em rebanhos leiteiros nos programas de manejo reprodutivo têm se dedicado a

estudar os efeitos de doses. A eficácia da administração, no entanto, é conhecida por estar relacionada com a concentração do hormônio na corrente sanguínea (TURINO et al., 2010).

### **2.3 Efeito ECC e BEN na concentração de P<sub>4</sub> e E2**

No período pós-parto, 6 a 59%, das vacas leiteiras de alta produção não voltam a ciclar, e, portanto não são expostas a P<sub>4</sub> até os 60 dias pós-parto, ou antes da primeira IA (CERRI et al., 2004; STEVENSON et al., 2006). Essas vacas apresentam redução na prenhez por IA e aumento das perdas embrionárias após a primeira IA (CHEBEL et al., 2006). As vacas anovulares são caracterizadas pelo padrão contínuo de ondas de crescimento folicular sem ovulação em vacas leiteiras lactantes as anovulações possivelmente associam-se ao estado de balanço energético negativo (BEN), escore de condição corporal (ECC) e ausência de responsividade do eixo hipotálamo-pituitária aos pulsos de GnRH/LH estimulados pela P<sub>4</sub> e E2 (CERRI, 2013). Portanto, uma das causas da baixa fertilidade em vacas leiteiras de alta produção é a concentração insuficiente de P<sub>4</sub>.

O baixo ECC está correlacionado com as concentrações mais baixas de hormônios metabólicos, tais como insulina e IGF-I, os quais têm mostrado ter um efeito sobre a reprodução (DISKIN et al., 2003; ZULU et al., 2002).

A maioria das vacas leiteiras, particularmente aquelas de alto rendimento, sofre de um período de BEN durante as primeiras semanas de lactação, quando a produção de energia para produção do leite excede o consumo de energia da dieta. Tal BEN está associado a uma síndrome multifatorial de subfertilidade durante este período, quando a função ovariana deve ser restabelecida para justificar uma nova gestação (MARTINEZ et al., 2008).

O elevado consumo de ração requerido para satisfazer o aumento da produção de leite eleva o fluxo sanguíneo no fígado, o que resulta em um metabolismo elevado de P<sub>4</sub>. O metabolismo do E2 e P<sub>4</sub> é 2,3 vezes maior durante a lactação do que períodos não lactantes (SANGRISTAVONG et al.,

2002). Isto causa uma redução nas concentrações de E<sub>2</sub> e P<sub>4</sub>, mesmo em meio a alta produção de hormônios E<sub>2</sub> pelo folículo ou CL (WILTBANK et al., 2006).

Alta produção de leite e alto metabolismo implicam em mudanças nas dimensões das vísceras, 20 a 31% da massa do fígado e do intestino aumentam em vacas em lactação em relação às não lactantes presumivelmente devido a fatores fisiológicos e nutricionais. Os valores de taxas de depuração metabólicas relatadas para grupos em jejum de não lactantes e vacas em lactação são de 2,61 e 4,26 L / h por kg, respectivamente (TURINO et al., 2010). Os requisitos de manutenção de uma vaca leiteira de alta produção da raça Holandesa é 25% maior do que há 30 anos (AGNEW et al., 2003) após as mudanças na conformação e tamanho dos animais (MARTINEZ et al., 2008). A mudança na massa do fígado deve-se tanto a um aumento no tamanho celular e no número de células. É consistente com o conceito de que o tamanho do fígado está relacionado com a carga de trabalho para atender às demandas fisiológicas e maior metabolismo (JOHNSON et al., 1990; MCLEOD; BALDWIN, 2000; SAINZ; BENTLEY, 1995).

O acúmulo de ácidos graxos não esterificados (AGNE) derivados do tecido adiposo durante o BEN no fluido restringe a proliferação e a qualidade das células da granulosa e, portanto, põe em risco o desenvolvimento de oócitos (LEROY et al., 2005; VANHOLDER et al., 2005). A extensão da fase pré-ovulatória, ou seja, atraso da ovulação, devido a baixos níveis de P<sub>4</sub> provoca processos de envelhecimento no oócito e compromete a fertilidade, o que leva a perdas reprodutivas (VANHOLDER et al., 2005). Após a fertilização, o embrião é formado, o qual se desenvolve no oviduto, durante os primeiros 3-4 dias antes da sua entrada no útero. O período embrionário dura até dia 42 após a fertilização e envolve uma série de períodos críticos, um dos quais compreende as três primeiras semanas de desenvolvimento ("morte embrionária precoce"), representando cerca de 20% das perdas totais. A partir deste momento até ao dia 42, as perdas são chamadas de "morte embrionária

tardia". Até 25% das mortes embrionárias foram observados em vacas com potencial genético para um alto rendimento de leite (GRIMARD et al., 2006).

A detecção de estro em vacas de alta produção também é dificultado pelas baixas concentrações de E2 no dia do estro. A nutrição também afeta taxa de concepção na IA seguinte. Vacas que desenvolvem hipocalcemia, cetose, acidose ou deslocamento de abomaso têm taxas de concepção inferiores e demoram mais tempo para tornarem-se prenhez. A perda excessiva da ECC e o aumento no teor de proteína da ração podem reduzir taxa de concepção enquanto que a suplementação com certas gorduras aumentam a P<sub>4</sub>. O aumento da taxa de eliminação metabólica de P<sub>4</sub>, no qual diminui as concentrações no sangue durante a clivagem embrião inicial até ao estágio de blastocisto está associada com a diminuição da taxa de concepção (STRONGE et al., 2005).

Altos níveis de nutrição pode também aumentar a taxa de depuração metabólica dos hormônios esteroides (MARTINEZ et al., 2008). Anovulação ocorre com uma frequência surpreendentemente elevada em vacas leiteiras de alta produção (GUMEN et al., 2003; LOPEZ et al., 2005; SOUZA et al., 2008). Em estudo retrospectivo (BAMBER et al., 2009) de 13 grandes rebanhos leiteiros comerciais nos Estados Unidos, a prevalência de anovulação foi de 23,3% em 5818 vacas que foram examinados cerca de 50 a 65 dias pós-parto utilizando sorologia para P<sub>4</sub> e ou ultrassonografia. Estes valores correspondem à prevalência de 32,2% de anovulação (com base em ultrassonografia para CL) ou 30,1% (com base na P<sub>4</sub> <0,5 ng mL<sup>-1</sup>).

#### **2.4 Efeito da baixa concentração de P<sub>4</sub> na reprodução de vacas leiteiras**

Um método simples e prático para aumentar a P<sub>4</sub> é complementá-la através de um dispositivo intravaginal (COLAZO et al., 2013). O hipotálamo de vacas em lactação deve ser exposto a pelo menos 3-5 dias de P<sub>4</sub> de forma a sensibilizá-lo ao E2, seguido de normalidade induzida pelo E2 há a liberação do pico LH e ovulação. Assim, o mecanismo fisiológico de bloqueio das vacas anovulares em responder a altos níveis de estrógeno com um pico de LH está



provavelmente relacionado com menor expressão de receptores de estrogênio no hipotálamo e, aparentemente, a  $P_4$  pode conseguir aumentar o número desses receptores no mesmo (GÜMEN; WILTBANK, 2005). Sendo assim a  $P_4$  exógena pode conseguir induzir ciclicidade em vacas leiteiras anovulares (CERRI et al., 2009; GÜMEN; WILTBANK, 2005; WALSH et al., 2007a; WALSH et al., 2007b).

O meio em que o folículo pré-ovulatório cresce pode-se determinar a sua persistência, bem como a maturação do oócito. Baixas concentrações de  $P_4$  aumentam a frequência dos impulsos de LH e estende a dominância folicular, o que é prejudicial se o folículo é mantido num ambiente deste tipo por um longo período de tempo (SAVIO et al., 1993). Observa-se em estudo que mesmo pequenas variações no comprimento de dominância folicular afetam o desenvolvimento do embrião (CERRI et al., 2009) e P / IA (BLEACH et al., 2004). Além disso, o aumento da frequência dos impulsos de LH inicia a maturação prematura do oócito (REVAH; BUTLER, 1996) e compromete o desenvolvimento inicial do embrião (AHMAD et al., 1995).

Oócitos de ovários de ondas foliculares com comprimento semelhante, mas sob baixas concentrações de  $P_4$  após o sexto dia de emergência retomou divisão meiótica prematuramente (INSKEEP, 2004).

A  $P_4$  e E2 são os principais reguladores dos receptores  $\alpha$  para esses hormônios durante o ciclo estral. Portanto, é razoável supor que reduzidas concentrações de esteroides no ovário e no plasma, normalmente observadas em vacas de leite de alta produção, poderia interromper o estímulo dos receptores necessário para o sucesso da gestação (CERRI et al., 2011b).

A concentração de E2 é inversamente relacionada com a IGFBP (“insulin-like growth factor binding protein”) e assim afeta a fração livre de IGF-1 (ECHTERNKAMP et al., 1994; GUZELOGLU et al., 2001; LUCY et al., 1995). Estas alterações podem ter implicações importantes para a divergência folicular e seu desenvolvimento (RIVERA; FORTUNE, 2003; SPICER, 2004).

A baixa concentração de  $P_4$  durante o desenvolvimento do folículo ovulatório reduz a concentração de IGF-1 total no fluido folicular do folículo pré-

ovulatório (CERRI et al., 2008). O IGF-1 aumenta a capacidade de resposta dos ovários às gonadotrofinas, capacidade esteroidogênica e proliferação de células da granulosa e protege o oócito e células da granulosa de apoptose (QUIRK et al., 2000; VELAZQUEZ et al., 2008; WASIELAK; BOGACKI, 2007). O folículo dominante, de primeira onda, desenvolve sob baixas concentrações de  $P_4$  ao contrario do folículo dominante da segunda onda. Baixas concentrações de  $P_4$  podem resultar num aumento de pulsatilidade de LH, o que pode prejudicar a qualidade do oócito (REVAH; BUTLER, 1996), de forma a influenciar a fertilidade.

Vacas avaliadas com baixa concentração de  $P_4$  respondem de forma semelhante às observadas quando o CL está se desenvolvendo, coincidindo com o crescimento do folículo dominante da primeira onda. Estas concentrações reduzidas de  $P_4$  induzem a um *up-regulation* prematuro de receptor de estrogênio  $\alpha$ , para maior liberação de prostaglandina ( $PGF_{2\alpha}$ ) pelo útero, e maior risco de luteólise prematura (GARVERICK et al., 1992; ZOLLERS et al., 1993). Todos esses fatores são susceptíveis de comprometer a fertilidade das vacas. O recrutamento e desenvolvimento do folículo ovulatório sob baixas concentrações de  $P_4$  causa um crescimento mais rápido do folículo dominante e maior concentração de E2 e LH, embora o IGF-1 seja menor, além de acelerar a luteólise influenciada pelo receptor de estrogênio  $\alpha$  e liberação de  $PGF_{2\alpha}$  pelo útero (CERRI et al., 2011b).

$P_4$  e E2 são os principais reguladores dos receptores de  $P_4$  e estrogênio durante o ciclo estral. Portanto, é razoável supor que reduzidas concentrações de esteroides ovarianos no plasma, normalmente observadas em vacas de alta produção de leite, poderia afetar o perfil ideal dos receptores de  $P_4$  e estrogênio no endométrio (CERRI et al., 2011b). Verificou-se que a concentração de  $P_4$  insuficiente durante o desenvolvimento do folículo ovulatório, e não necessariamente ao longo de todo o período de pós-parto está associada com baixa fertilidade (BISINOTO et al., 2010).

As baixas concentrações de  $P_4$  conduzem a concentrações excessivas de outros hormônios que podem causar a morte do embrião. Assim, a

mortalidade embrionária após reconhecimento materno da prenhez e durante a placentação é um problema significativo na vaca leiteira. Ela está associada com a baixa  $P_4$  durante os dias 28 a 37. Neste período a baixa  $P_4$  pode ser devido à redução da secreção pelo CL, ou a um maior metabolismo de  $P_4$ , como apontado anteriormente (INSKEEP, 2004).

Segundo Inskeep (2004) as concentrações de  $P_4$  também são resultados nas mortes embrionárias durante os seguintes períodos:

- O período pós-ovulatório, entre a fecundação e o sexto dia, em vacas que os folículos persistentes desenvolvem sob baixa  $P_4$  durante a fase luteal anterior, esses embriões não conseguem chegar a 16 células;
- Do quarto ao nono dia depois da fecundação, quando a secreção excessiva de  $PGF_{2\alpha}$  pode ser embriotóxico e luteolítica, se a  $P_4$  não estava presente antes do estro, o útero não tem receptores de  $P_4$ ;
- Reconhecimento materno da gravidez, dias 14 a 17, quando as baixas taxas de prenhez foram associadas com a baixa  $P_4$  e alto  $17\beta$  estradiol;

O período embrionário tardio, que compreende os dias 28 a 42, quando placentação e anexos estão em andamento. A baixa  $P_4$  resulta em perda, mas o embrião geralmente morre antes de regressão lútea (INSKEEP, 2004).

## **2.5 Efeito da alta concentração de $P_4$ na reprodução de vacas leiteiras**

Mais  $P_4$  durante o desenvolvimento folicular pode diminuir pulsos de LH, possivelmente, a melhoria da competência do folículo dominante, a qualidade do oócito ovulado, e a qualidade do ambiente uterino (MIHM et al., 1994; PURSLEY; MARTINS, 2012; REVAH; BUTLER, 1996), pois o aumento das concentrações de  $P_4$  durante o desenvolvimento do folículo pode produzir óvulos de melhor qualidade ou afetar a formação CL, subsequente alterando o IGF-1 folicular. O aumento de IGF-1 livre no fluido folicular no momento do desvio do folículo dominante (FORTUNE et al., 2004. ; SPICER, 2004), parece estar relacionado com o IGFBP-2 do fluido folicular que está inversamente relacionada com a síntese de  $E_2$  (ECHTERNKAMP et al., 1994 ; GUZELOGLU et al., 2001; LUCY et al., 1995).

Vacas com alta concentração sérica de  $P_4$  apresentam uma concentração maior de IGF-1 total e livre no fluido folicular, embora a concentração de E2 fosse menor nas vacas com baixa concentração de  $P_4$ . Na verdade, as relações negativas foram observadas entre as concentrações de fluido folicular de E2 e total ou livre de IGF-1. Essas diferenças podem explicar as mudanças na dinâmica folicular e um possível papel de  $P_4$  durante o desenvolvimento do folículo ovulatório na fertilidade (BISINOTTO et al., 2010). Melhorou-se a taxa de prenhez e diminuiu a perda de gestação quando o folículo ovulatório é desenvolvido sob elevadas concentrações de  $P_4$  (BISINOTTO et al., 2010; CUNHA et al., 2008). No entanto, apesar das mudanças acentuadas do folículo, há diferenças na fertilização ou qualidade do embrião com seis dias após a IA entre vacas com alta e baixa  $P_4$  (CERRI et al., 2011).

Foi descrito uma relação positiva entre maiores níveis circulantes de  $P_4$  durante o crescimento folicular e qualidade embrionária (DENICOL et al., 2012; RIVERA et al., 2011; WILTBANK et al., 2011). O mecanismo exato pelo qual  $P_4$  melhora a qualidade do embrião não é completamente conhecido, mas pode estar relacionada com a diminuição da exposição do oócito ao desenvolvimento de LH, evitando a sua maturação prematura (CERRI et al., 2009; REVAH; BUTLER, 1996). Portanto, os dispositivos intravaginais contendo  $P_4$  e outras combinações de hormônios utilizados na sincronização deverão ser estrategicamente usados para direcionar maiores níveis de  $P_4$  durante os protocolos de sincronização, especialmente em vacas de alta produção, que apresentam maior consumo de matéria seca e maior metabolismo de esteroides no fígado (SANGSRITAVONG et al., 2002; WILTBANK et al., 2006).

O ambiente uterino ideal para o desenvolvimento do embrião e atenuação da síntese da prostaglandina ( $PGF_{2\alpha}$ ) durante o período de reconhecimento materno da prenhez é dependente da  $P_4$ . O tempo de sensibilização correto no receptor de estrogênio- $\alpha$  e, receptor de ocitocina no endométrio são importantes para regular a síntese de  $PGF_{2\alpha}$  e luteólise (SPENCER; BAZER, 2004).

A suplementação de  $P_4$  durante a fase luteal antes da IA resulta numa maior taxa de concepção (ROSENBERG et al., 1990; WHERMAN et al., 1993), assim como estratégias para aumentar o folículo durante proestro (CERRI et al., 2004) ou para aumentar a  $P_4$  depois da ovulação (SANTOS et al., 2001) demonstraram alguns efeitos positivos sobre a P/IA. A alta produção de vacas leiteiras em lactação não são capazes de manter as concentrações ideais de circulação do esteroide do ovário para otimizar a fertilidade (CERRI et al., 2011b).

Inserções intravaginais contendo  $P_4$  têm sido utilizadas para melhorar a sincronia do estro e da ovulação (CARRICK e SHELTON, 1967; SCANLON et al., 1972) e para promover o restabelecimento da ovulação pós-parto em vacas de leite (CERRI et al., 2009; CHEBEL et al., 2006). Seu uso tem sido recomendado em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), particularmente em vacas anovulares para melhorar P/IA (STEVENSON et al., 2006). A  $P_4$  exógena pode conseguir induzir ciclicidade em vacas leiteiras anovulares (CERRI et al., 2009<sup>a</sup>; GÜMEN; WILTBANK, 2005; WALSH et al., 2007a e WALSH et al., 2007b).

Protocolos de sincronização de cio baseados em  $E_2$  e  $P_4$  foram desenvolvidos ainda nos anos 60 em gado de corte (WILTBANK; KASSON, 1968). Assim como os protocolos baseados em GnRH e  $PGF_{2\alpha}$ , os protocolos envolvendo  $E_2$  e  $P_4$  também evoluíram gradativamente e são os programas de IATF mais utilizados no Brasil em gado de leite e corte (CERRI, 2013).

Estudos na Nova Zelândia usaram de maneira eficiente uma combinação de  $P_4$ ,  $PGF_{2\alpha}$  e benzoato de estradiol (BE) para aumentar o número de vacas inseminadas no início da estação de monta em sistemas de produção de leite sazonais à pasto. Quando vacas lactantes receberam 2 e 1 mg de BE junto a colocação de um dispositivo de liberação de  $P_4$  e  $PGF_{2\alpha}$  na retirada do dispositivo 7 dias depois, foi observado aumento na taxa de serviço e prenhez no primeiros dias da estação de monta (DAY et al., 2000).

Estudos demonstram que o tratamento com um CIDR<sup>®</sup> em vacas sem corpo lúteo (CL) resultam em concentração média de  $P_4$  entre 0,65 e 0,80 ng

mL<sup>-1</sup>, durante um tratamento de 7 dias (CERRI et al., 2009). Em comparação com as vacas controle, o tratamento com uma ou duas pastilhas de CIDR<sup>®</sup> aumentou as concentrações de P<sub>4</sub> durante o protocolo de IATF para 0,86 e 1,76 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente. O maior aumento da concentração de P<sub>4</sub> resultante do tratamento com CIDR<sup>®</sup> é provavelmente o resultado de contribuição endógena de P<sub>4</sub> a partir do CL (CERRI et al., 2009). O autor concluiu que o tratamento era eficaz na suplementação de P<sub>4</sub>, resultando numa resposta dependente da dose na concentração plasmática.

Observou-se que vacas de alta produção leiteira que apresentam uma baixa concentração de P<sub>4</sub> (<1 ng mL<sup>-1</sup>) não tiveram melhora na fertilidade tanto com um ou dois implantes de CIDR<sup>®</sup>. Portanto, o autor sugeriu que as vacas com baixa P<sub>4</sub> pode requerer aumento da concentração de P<sub>4</sub> acima de 1,8 ng mL<sup>-1</sup>, a fim de se ter P/IA semelhante às vacas de alta P<sub>4</sub> (LIMA et al., 2009).

Em outro trabalho, (BISINOTO et al., 2013), é demonstrado que vacas sem CL submetidas a oito dias com dois implantes intravaginais (CIDR<sup>®</sup>) obtiveram concentração de P<sub>4</sub> de 2,65 ng mL<sup>-1</sup> e, a P/IA foi semelhante à vacas em diestro. Por isto que tem se desenvolvido estudos do efeito da dose de P<sub>4</sub> administrada por via parenteral ou intravaginal sobre os resultados de programas reprodutivos em bovinos de leite (TURINO et al., 2010).

As concentrações de P<sub>4</sub> em vacas leiteiras em lactação oscilam entre 4,0 e 5,8 ng mL<sup>-1</sup> durante meados diestro (SARTORI et al., 2004), que são cerca de 5 vezes maior do que o aumento resultante da inserção de um único dispositivo de P<sub>4</sub> (CERRI et al., 2009a). Aumento das concentrações de P<sub>4</sub> antes e depois da IA são muitas vezes associados positivamente com a fertilidade (INSKEEP; DAILEY, 2005).

A ação da P<sub>4</sub> impede a “expressão” de receptores de ocitocina no endométrio até meados diestro, quando os receptores de P<sub>4</sub> são reprimidos no epitélio luminal e glândulas superficiais e a ligação da ocitocina aos seus receptores desencadeiam a cascata luteolítica (McCRACKEN et al., 1999).

Foi proposto que a exposição à P<sub>4</sub> antes da ovulação tem um efeito sobre o intervalo pós-parto de vacas suplementadas com um progestágeno

durante o desenvolvimento do folículo ovulatório, o mesmo tinha aumentado a expressão dos receptores do endométrio para a  $P_4$  e redução da expressão de receptores para a ocitocina no dia 5 do ciclo subsequente, em comparação com os controles não tratados. Esta é provavelmente a causa da capacidade de resposta do endométrio para a liberação prematura de ocitocina em vacas não expostas à  $P_4$  no ciclo estral anterior (ZOLLERS et al., 1993).

Sá Filho et al. (2009) relataram menor número de RNAm para os receptores de ocitocina nos dias -2, 0, 5 em relação a ovulação em vacas após o parto pré-tratados com  $P_4$ , mas não há alterações na expressão de mRNA de receptores de  $P_4$  durante o mesmo período. Portanto, é plausível que a exposição à  $P_4$  insuficiente durante o desenvolvimento do folículo ovulatório pode aumentar a capacidade de resposta do endométrio para ocitocina e resultar em luteólise prematura (BISINOTO et al., 2010).

A  $P_4$  exerce uma reação negativa na pulsatilidade de LH, e este último estimula a esteroidogênese e crescimento de folículos dominantes (EVANS et al., 1997). Em conformidade, as vacas induzidas a ovular o folículo dominante na primeira onda tiveram menor concentração de  $P_4$  a partir da primeira aplicação de GNRH à  $PGF_{2\alpha}$  do protocolo Ovsynch. Estudos relataram que a ovulação de folículos maiores, com maior capacidade de esteroidogênica resultou em CL maior, aumento da concentração de  $P_4$  durante o diestro subsequentes, e aumentou P/IA (LOPES et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2001).

## **2.6 Fatores externos que contribuem alteram concentrações de $P_4$**

Redução da fertilidade de vacas leiteiras durante os períodos de temperatura elevada, umidade, ou ambos podem estar associados com baixa concentração de  $P_4$  plasmática. O alívio do estresse térmico por resfriamento eficiente é condição essencial para melhorar a fertilidade por meio de tratamento hormonal. O pequeno desenvolvimento embrionário e baixa produção de IFN- $\tau$  estão associados com a função lútea prejudicada, refletido por um aumento no atraso pós-ovulatória e baixas concentrações de  $P_4$  na

fase lútea (LAMMING e MANN, 2001). Por sua vez, a produção de embriões com quantidades suficientes de IFN- $\tau$  por 16 dias é necessária para evitar a secreção de prostaglandinas no endométrio e luteólise subsequente (MANN et al., 1999 ).

Experimento demonstra que concentrações ideais de P<sub>4</sub> até o dia 5 pós-estro estão associados positivamente com o desenvolvimento embrionário (GREEN et al., 2005). Larson et al., (1997) mostraram que a concentração de P<sub>4</sub> no leite foi maior no dia 4,5 pós-inseminação em vacas prenhes contra não prenhes. A suplementação de P<sub>4</sub> durante o início (dia 5 a 9), mas não tardia (d 12 a 16) da fase lútea aumenta o comprimento do trofoblasto e produção de IFN- $\tau$  nos 16 dias pós-fertilização (MANN et al., 2006).

Mudanças induzidas nas secreções endometriais são essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento de blastocisto (SPENCER et al., 2008). Assim, alterando a função lútea e diminuindo a concentração de P<sub>4</sub> na circulação sob estresse térmico pode prejudicar o desenvolvimento embrionário e aumentar a perda embrionária precoce.

Estudos que tentam moderar os efeitos deletérios do estresse térmico sobre a função lútea, induzindo um CL acessório e aumentando o tecido luteal tiveram resultados ambíguos. A administração de GnRH entre d 5 e 15 pós-IA demonstrou aumento de 15% (LÓPEZ-GATIUS et al., 2006; WILLARD et al., 2003), enquanto outros não encontraram nenhuma melhoria na fertilidade no verão (FRANCO et al., 2006). Da mesma forma, a administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) no dia 5 ou 6 pós-IA não afetou (SCHMITT et al., 1996) ou tiveram aumento de 13% (BELTRAN; VASCONCELOS, 2008). Variações no dia da administração de hCG ou GnRH pode explicar as diferenças entre os estudos em taxa de concepção , devido a diferenças no momento em que houve o aumento de produção da P<sub>4</sub> e da concentração no plasma. As diferenças entre os estudos também pode estar relacionada com a severidade e duração das tensões térmicas a que as vacas foram expostos e, mais importante, para a eficácia de arrefecimento das estratégias utilizadas e a sua capacidade de manutenção da temperatura.



Outro estudo avaliou a relação entre a temperatura ambiente e a temperatura do corpo. A temperatura crítica superior para o estresse térmico inicia-se entre 25 e 26 °C (BERMAN et al., 1985). A taxa de concepção passou de 61 para 45% quando a temperatura retal de 12 h pós inseminação aumentou 1°C (ULBERG; BURFENING, 1967). Além disso, bovinos com temperatura retal de 40°C como resultado da exposição a 32,2°C a temperatura ambiente por 72 horas após inseminação tiveram taxas de concepção de 0% em comparação com uma taxa de concepção de 48% quando a temperatura retal foi de 38,5°C para vacas em uma temperatura ambiente de 21,1°C (ULBERG; BURFENING, 1967).

Embora as alterações na temperatura retal ser um indicador de estresse térmico em bovinos, estes dados não estão sempre disponíveis. Portanto, o estresse térmico é frequentemente definido quando o índice de temperatura e umidade (ITU) excede 68 (COLLIER et al., 2013).

As vacas de leite apresentam uma concentração menor de P<sub>4</sub> durante o verão do que o outono (HOWELL et al., 1994) ou inverno (JONSSON et al., 1997; WOLFENSON et al., 2002). No entanto, as concentrações foram relatadas a serem maior (TROUT et al., 1998; WILSON et al., 1998) ou similar (ROTH et al., 2000) em vacas sob estresse térmico agudo em comparação com aqueles em condições normotérmicos.

Estudo *in vitro* mostrou diminuição da produção de P<sub>4</sub> pelas células foliculares e luteinizadas colhidas durante o verão em comparação com o inverno. Esta redução de produção de P<sub>4</sub> é principalmente atribuída aos efeitos da exposição ao calor em células derivadas de células da teca (WOLFENSON et al., 2002). A exposição crônica sazonal tem um efeito deletério na função folicular, que leva à formação de um corpo lúteo sub ótimo e, resultando em baixas concentrações plasmáticas de P<sub>4</sub> (WOLFENSON et al., 2000).

O tecido do endométrio *in vitro* submetido a temperaturas elevadas aumentaram liberação de prostaglandinas no meio de cultura (PUTNEY et al., 1988a). Se um tal efeito ocorrer *in vivo*, pode iniciar regressão lútea precoce ou

comprometer a função do CL. Além disso, a hipertermia durante os 17 dias de prenhez pode aumentar da produção de  $PTGF_{2\alpha}$  em resposta à ocitocina (WOLFENSON et al., 1993). Assim, parece que a refrigeração é necessária a partir de pelo menos 42 dias antes da ovulação (AL-KATANANI et al., 2002b) para mais de 40 dias pós-inseminação (CARTMILL et al., 2001) a fim dos impactos negativos do estresse térmico serem atenuadas.

Os métodos atuais de resfriamento podem melhorar a eficiência reprodutiva, mas a maioria não mantém o ITU abaixo de 68 ou a temperatura do corpo abaixo de  $39^{\circ}\text{C}$ , por isso algum comprometimento na fertilidade deve ser esperado.

Estresse por calor pode agravar ainda mais os efeitos do BEN. Durante períodos de estresse por calor, vacas em lactação têm um apetite reduzido e maior perda ECC no pós-parto. Além disso, as concentrações de glicose, IGF-I e de colesterol são mais baixas, enquanto que as concentrações de AGNE e uréia são mais elevadas no sangue e no fluido folicular no calor (SHEHAB-EL-DEEN et al., 2010). Essas mudanças, junto com uma diminuição no diâmetro do folículo dominante, resultam em um desafio maior em vacas alcançarem a alta eficiência reprodutiva em climas subtropicais e tropicais.

Os levantamentos acima reforçam a observação de que o efeito combinado de estresse térmico pelo calor, o estresse metabólico (BEN e baixo ECC), e desordens reprodutivas (anestro pós-parto) resultam na amplificação da deficiência da  $P_4$  (FRIEDMAN et al., 2012).

### **III OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo desse trabalho foi:

- a) avaliar o efeito dos dispositivos intravaginais com diferentes concentrações de P<sub>4</sub> durante protocolo de IATF;
- b) a interferência da produção de leite;
- c) concentração sérica de P<sub>4</sub> no terceiro dia de protocolo e,
- d) temperatura ambiental associada à taxa de prenhez após protocolo de IATF.

### **IV HIPÓTESE**

A hipótese elaborada foi a de que durante o protocolo de IATF a suplementação de vacas de leite em lactação com dispositivo intravaginal com maior concentração de P<sub>4</sub> aumenta a taxa de prenhez.

## **V MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Animais:**

Foram selecionadas 102 vacas em lactação de diferentes raças leiteiras (85 vacas 7/8 Holandês preto e branco, quatro Jersey, cinco Girolando e oito sem raça definida - S.R.D.), pluríparas e volume de produção em 07 propriedades com sistema de produção à pasto com duas ordenhas diárias na região de Araçatuba/SP, estado de São Paulo, no período de setembro de 2012 a maio de 2013.

### **5.2 Delineamento experimental:**

Os critérios para inclusão no estudo foram vacas em lactação com muco vaginal transparente ao exame visual com espéculo (SHELDON, 2006) com presença de corpo lúteo (CL) ou folículo acima de 8,5 mm de diâmetro até 20 mm, sugerindo ciclicidade (GINTHER et al., 1996). Foi realizada avaliação por ultrassom (CHISON 500 VET) com transdutor linear retal de 5 MHz, no dia do início do protocolo (D0) observou-se 65 vacas com CL e 26 sem CL. Para a mensuração do diâmetro folicular foram utilizadas imagens congeladas da área máxima aparente de cada folículo possivelmente dominante, utilizando-se o diâmetro médio de duas direções em ângulos retos. Foi avaliado o ECC das vacas no D0, sendo o grupo que recebeu dispositivos de 1,0g tiveram a média de ECC  $2,74 \pm 0,29$  e, as que receberam dispositivos com 1,3g a média de  $2,68 \pm 0,29$ , utilizando uma escala de 1 a 5 seguindo metodologia descrita por Fergusson et al. (1994).

Das 102 vacas selecionadas no início do experimento, 11 foram descartadas por perda do dispositivo durante o protocolo (n=6), falha na aplicação dos hormônios (n=3) e venda durante o período experimental (n=2).

Ao final foram analisados os dados de 91 animais com produção média diária de  $22,4 \pm 5,6$  litros/dia e com média de 145 ( $\pm 82$ ) dias em lactação (DEL) no dia inicial do experimento (D0).

### 5.3 Sincronização do estro e tratamento hormonal:

No início do protocolo (D0), período da manhã, as vacas receberam de forma randomizada e inteiramente ao acaso dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> contendo 1,0g (n=43) ou 1,3g (n=48) (Cronipres<sup>®</sup>, Biogenesis Bagó Saúde Animal Ltda, Argentina) e injeção intramuscular (IM) contendo 2 mg de benzoato de E2 (Bioestrogen<sup>®</sup>, Biogenesis Bagó Saúde Animal Ltda, Argentina), no oitavo dia (D8) houve a retirada do dispositivo intravaginal e aplicação IM de 0,15 mg de D-Cloprostenol (Croniben<sup>®</sup>, Biogenesis Bagó Saúde Animal Ltda., Argentina). Após 24 horas foi aplicado 1mg de benzoato de E2 e a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) foi realizada aproximadamente 56 horas após o momento da retirada do dispositivo (Figura 1). Foi utilizado sêmen convencional de 24 touros distribuídos de forma aleatória e cinco inseminadores. O diagnóstico de gestação foi realizado após 30 dias da inseminação com auxílio do ultrassom (CHISON 500 VET com transdutor linear retal de 5 MHz), sendo consideradas prenhas aquelas com presença de um embrião exibindo batimentos cardíacos e rodeados por líquido corio-alantóide no lúmen uterino.

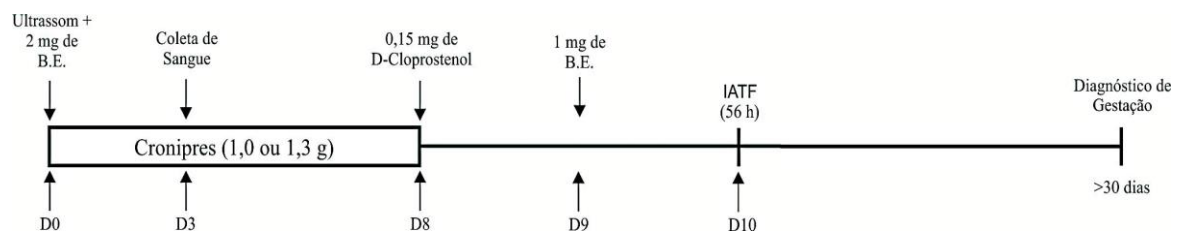


FIGURA 1 - Diagrama do protocolo de IATF adotado. B.E. - Benzoato de Estradiol; PGF<sub>2α</sub> – prostaglandina F<sub>2α</sub>.

### 5.4 Amostras de soro e análise hormonal

No dia 3 (D3), após a inserção dos dispositivos, foi coletada amostras de sangue de uma porcentagem das vacas em experimento (n=61) pela punção da veia ou artéria caudal mediana no período da manhã antes da primeira

alimentação, utilizou-se tubos a vácuo (Vacutainer®) que após a coagulação o plasma foi separado e armazenado à -20°C para ensaio laboratorial.

### **5.5 Radioimunoensaio**

A quantificação dos níveis séricos de P<sub>4</sub> foi realizada no Laboratório de Endocrinologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP-Campus de Araçatuba, por radioimunoensaio em fase sólida utilizando o protocolo comercial IMMUNOTECH® (IMMUNOTECH S.A.S – Marseille, França). O soro bovino (50 µL) juntamente de 500 µL de P<sub>4</sub> marcada com <sup>125</sup>I foram adicionados a tubos contendo anticorpos anti-progesterona. Em seguida, os tubos foram incubados sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente. Após o término da incubação, o conteúdo dos tubos foi eliminado e a radioatividade remanescente determinada em contador gama (Autogamma Cobra II-Packard). Os valores de radiação obtidos das amostras foram interpolados com uma curva padrão construídos a partir de valores conhecidos para determinação da concentração.

O coeficiente de variação (CV) intraensaio foi de 0,18% para o controle alto (6,0439 ng mL<sup>-1</sup>), 0,02% para o controle baixo (0,4947 ng mL<sup>-1</sup>) com sensibilidade de 0,0084 ng mL<sup>-1</sup>.

Para a avaliação da presença de CL no D3, foi considerada a concentração  $\geq 2$  ng mL<sup>-1</sup> de P<sub>4</sub> (MANN, 2009).

### **5.6 Temperatura Ambiente**

A temperatura ambiente máxima e mínima diária da região nos 50 dias antes da IATF (durante a foliculogênese) foi fornecida pela coordenadoria da assistência técnica integrada (CATI) de Araçatuba-SP. A temperatura ambiente máxima no dia da IATF também foi monitorada durante o experimento a fim de se avaliar o possível efeito de estresse térmico nas vacas incluídas nesse estudo.

## 5.7 Análise Estatística

As variáveis analisadas foram: prenhez aos 30 dias após inseminação, dispositivos intravaginal (1,0g ou 1,3g), produção de leite (L/dia) no D0, concentração de P<sub>4</sub> (ng mL<sup>-1</sup>) no D3, a média da temperatura ambiente máxima (°C) durante os 50 dias que antecedem a IA, no D0 do protocolo de sincronização e no dia da IA, presença ou ausência de corpo lúteo no D3, dias em lactação, propriedades, escore de condição corporal, inseminador e touro.

A taxa de prenhez em função da concentração de P<sub>4</sub> do dispositivo (1,0 ou 1,3 g) e a ocorrência de prenhez na presença ou ausência de corpo lúteo ( $\geq 2$  ng mL<sup>-1</sup> e  $< 2$  ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente) foi analisada pelo teste  $\chi^2$ .

Para avaliação da homogeneidade entre os grupos com diferentes dispositivos ou entre grupos de animais que ficaram prenhes ou não (retrospectivamente), comparamos entre esses sub-grupos a produção de leite (no D0), a concentração sérica de P<sub>4</sub> (no D3) e a média da temperatura ambiente máxima (nos 50 dias que antecederam a IA e no dia da IA). Inicialmente foi avaliada a normalidade (Kolmogorov e Smirnov) e a homocedasticidade (Teste de Bartlett) dos grupos, quando atendidos os requisitos foi utilizado o teste t não pareado, e nos casos de ausência de homocedasticidade ou distribuição normal foram utilizados testes t não pareados com correção de Welch ou teste de Mann Whitney, respectivamente.

Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey para comparar a produção de leite (no D0), concentração sérica de P<sub>4</sub> no D3 e a média das temperaturas máximas dos 50 dias que antecederam a IA entre 4 grupos (prenhes com 1,0 ou 1,3 g de P<sub>4</sub> e não prenhes com 1,0 ou 1,3 g de P<sub>4</sub> no dispositivo). Quando não apresentaram normalidade (Kolmogorov e Smirnov) e homocedasticidade (Teste de Bartlett) os dados foram transformados em log ou raiz quadrada e novamente analisada.

As correlações entre as variáveis: produção de leite no D0, concentração sérica de P<sub>4</sub> no D3, a média da temperatura ambiente máxima no D0 e gestação (prenhes= 1 e não prenhes= 0) foram avaliadas para cada um dos 4

grupos (prenhes com 1,0 ou 1,3 g de P<sub>4</sub> no dispositivo e não prenhes com 1,0 ou 1,3 g de P<sub>4</sub> no dispositivo). Quando os dados apresentavam distribuição normal foi utilizada a correlação de Pearson, e caso contrário foi efetuado a correlação de Spearman. Além disso, foi avaliada a correlação entre produção de leite no D0 e o resultado do diagnóstico de gestação distribuindo os dados de maneira binária (1= prenha, 0 = não prenha).

Os testes de associação ( $\chi^2$ ), testes t e ANOVA e as correlações foram avaliadas utilizando o programa Graph Pad Prism (versão 6.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia EUA).

A interferência dos fatores (produção de leite, concentração sérica de P<sub>4</sub>, média das temperaturas máximas nos 50 dias que precederam a IA, no D0 e no D3, presença ou ausência de corpo lúteo no D3, dias em lactação, propriedades, escore de condição corporal, dispositivo intravaginal, inseminador e touro) sobre o diagnóstico de gestação foi avaliada utilizando-se análise de regressão de acordo com o método Hosmer-Lemeshow (1989) com o procedimento logístico (PROC LOGISTIC) do programa SAS. Basicamente esse método envolve cinco etapas: inicialmente uma análise univariada utilizando o teste  $\chi^2$  para verificar a associação ente cada uma das variáveis estudadas com a variável dependente; construção de um modelo completo utilizando todas as variáveis significativas na análise univariada; eliminação das variáveis não significativas do modelo completo e comparação do modelo reduzido com o modelo precedente para o ajuste do modelo (“backward elimination procedure”); avaliação das possíveis interações duplas de variáveis e avaliação do ajuste do modelo usando a estatística Hosmer-Lemeshow. As variáveis que apresentaram o valor de P menor que 5% ( $p < 0,05$ ) na primeira etapa foram incluídas no modelo inicial. A modelagem continuou até que todos os efeitos principais ou termos da interação fossem significativos de acordo com a estatística de Wald ( $p < 0,05$ ).



## VI RESULTADOS

### 6.1 Taxa de concepção em função da concentração de progesterona entre os dispositivos intravaginais (1,0 ou 1,3 g).

Após 30 dias do protocolo de IATF com dispositivo de diferentes concentrações de P<sub>4</sub> utilizando 91 vacas de leite em lactação foram observadas 19,8% (18/91) de vacas prenhas e, 80,2% (73/91) de vacas não prenhas (Figura 2).

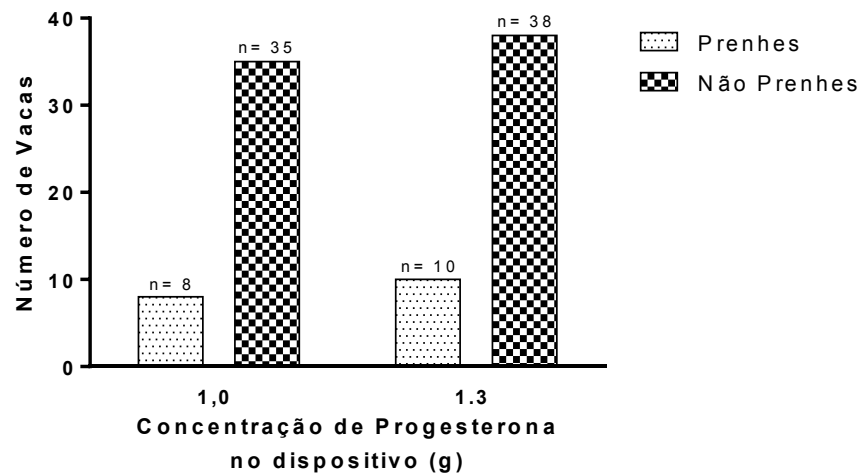


FIGURA 2 - Distribuição de vacas prenhas e não prenhas com dois diferentes dispositivos intravaginais (1,0g e 1,3g) após protocolo de IATF.

Considerando somente as vacas que ficaram prenhas (n=18), não houve diferença no número (p=0,99) e no percentual (p=0,96) de prenhas entre os grupos que receberam dispositivo com 1,0 ou 1,3g de P<sub>4</sub> no protocolo de IATF (Figura 3).

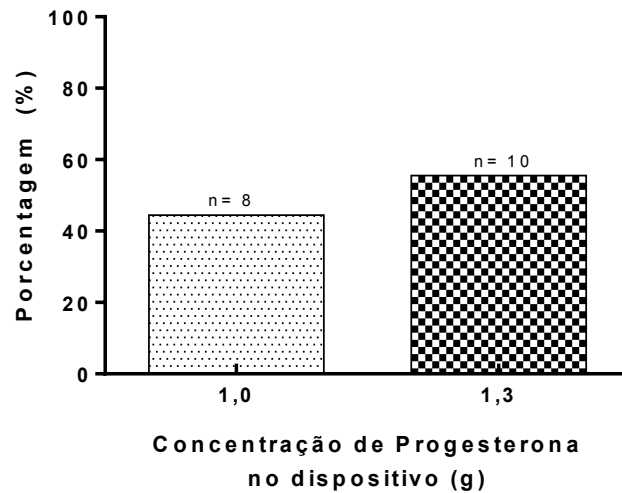


FIGURA 3 - Número e proporção de vacas prenhes com dispositivo intravaginal com 1,0g ou 1,3g concentração de P<sub>4</sub> em protocolos de IATF.

## 6.2 Concentrações séricas de P<sub>4</sub> no D3 em função do dispositivo intravaginal (1,0 ou 1,3 g) e a presença ou ausência de C.L.

A concentração sérica de P<sub>4</sub> no terceiro dia (D3) do protocolo de sincronização de ovulação não diferiu entre os dispositivos ( $p=0,92$ ); ou seja, a suplementação de P<sub>4</sub> com dispositivo intravaginal com 1,3g não elevou a concentração sérica ( $3,65 \pm 2,53 \text{ ng mL}^{-1}$ ) quando comparamos com as vacas que receberam 1,0g de P<sub>4</sub> ( $3,58 \pm 2,55 \text{ ng mL}^{-1}$ ) via dispositivo intravaginal (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentração de P<sub>4</sub> (média, valor máximo e mínimo) no terceiro dia (D3) do protocolo de IATF em vacas leiteiras em lactação.

Prenhez	Conc. de P <sub>4</sub> no dispositivo (g)	n	Concentração de P <sub>4</sub> no D <sub>3</sub> (ng mL <sup>-1</sup> )		
			Média ± DP	Máxima	Mínima
<b>PRENHES</b>	1	7	2,53 ± 2,35	7,39	0,85
	1,3	5	3,50 ± 2,97	8,69	1,32
<b>NÃO PRENHES</b>	1	22	3,91 ± 2,52	10,8	0,40
	1,3	27	3,68 ± 2,51	9,74	0,73

A média da concentração sérica de  $P_4$  no D3 do protocolo de IATF não foi diferente ( $p=0,42$ ) entre vacas prenhes ( $2,93\pm 2,54$  ng mL<sup>-1</sup>) e vacas não prenhes ( $3,6\pm 2,32$  ng mL<sup>-1</sup>; Figura 4).

Quando comparados os sub grupos, vacas prenhes e não prenhes com seus respectivos dispositivos utilizados (1,0g ou 1,3g) não houve diferença,  $p=0,73$ .

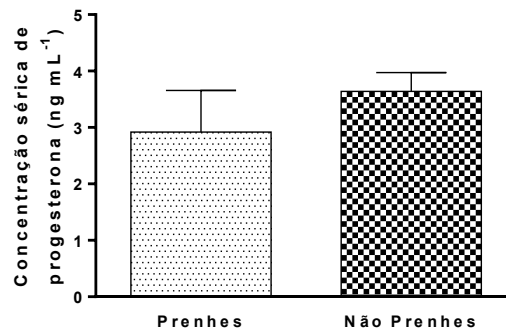


FIGURA 4 - Variação na concentração sérica de  $P_4$  (ng mL<sup>-1</sup>) em vacas leiteiras em lactação no terceiro dia de protocolo de IATF comparando as vacas prenhes (n=12) com as não prenhes (n=49). Média e desvio padrão da media ( $p = 0,42$ ).

Não houve diferença ( $p=0,24$ ) no número de vacas prenhes quando comparamos vacas com presença ( $\geq 2$ ng mL<sup>-1</sup>) ou ausência ( $< 2$ ng mL<sup>-1</sup> de  $P_4$ ) de corpo lúteo no D3 (Figura 5).

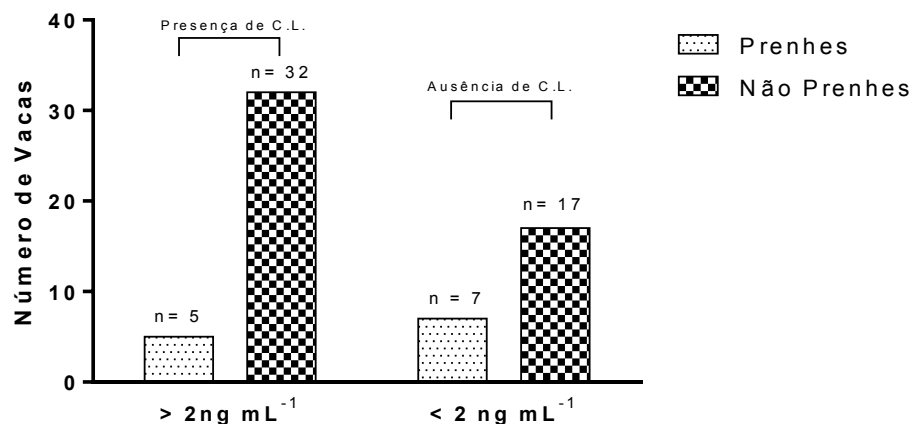


FIGURA 5 - Número de vacas prenhes ou não prenhes considerando a presença ( $\geq 2$ ng mL<sup>-1</sup>) ou ausência de CL ( $< 2$ ng mL<sup>-1</sup>) estabelecida em função da concentração de  $P_4$  no D3 do protocolo de sincronização de ovulação.

### 6.3 Concentrações séricas de P<sub>4</sub> no D3 em função da produção de leite e temperatura ambiente.

Não foi observada correlação ( $p=0,45$ ) entre produção de leite e a concentração de P<sub>4</sub> no D3 do protocolo de sincronização (Figura 6).

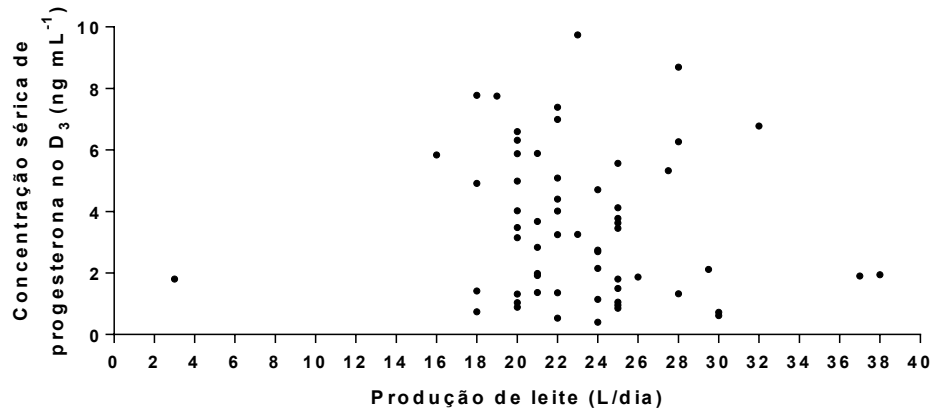


FIGURA 6 - Correlações entre produção de leite (L/dia) e concentração de P<sub>4</sub> no D3 em todas as vacas (prenhes e não prenhes) de todos os tratamentos (n=61).

Quando as vacas foram separadas em função da quantidade de P<sub>4</sub> no dispositivo intravaginal, observamos que as vacas não prenhes que receberam dispositivos com 1,0g de P<sub>4</sub> apresentaram correlação negativa ( $r=-0,47$  e  $p=0,02$ ) entre a produção de leite e a concentração de P<sub>4</sub> (Figura 7 A). Por outro lado, as vacas não prenhes que receberam 1,3g de P<sub>4</sub> não apresentaram correlação ( $p=0,45$ ) entre produção de leite e a concentração de P<sub>4</sub> (Figura 7B), o mesmo foi observado nas vacas prenhes que receberam dispositivos com 1,0 e 1,3 g de P<sub>4</sub>,  $p=0,73$  e  $p=0,83$ , respectivamente (Figura 7C e D).

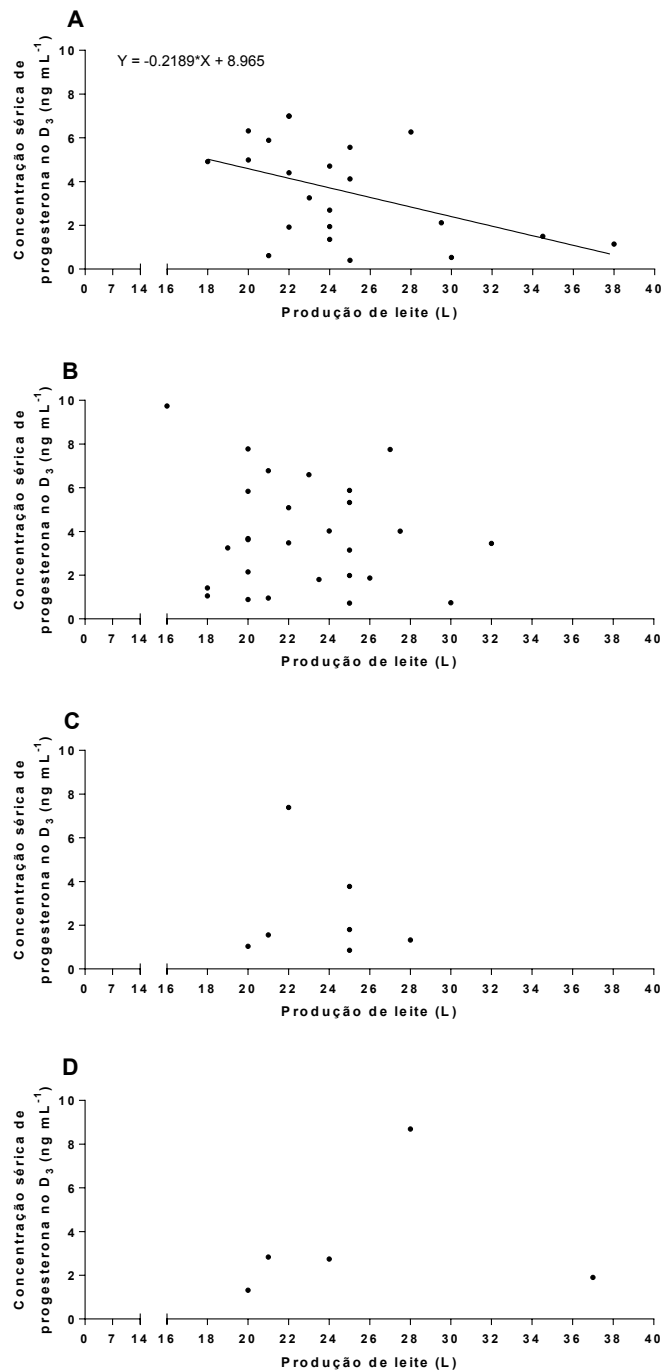


FIGURA 7 - Correlações entre produção de leite (L/dia) e concentração e P<sub>4</sub> (ng ml<sup>-1</sup>). A. vacas não prenhes com dispositivo de 1,0g P<sub>4</sub> (n=22) p=0,02 e r=-0,47; B. vacas não prenhes com dispositivo de 1,3g P<sub>4</sub> (n=27) p=0,45; C. vacas prenhes com dispositivo de 1,0g P<sub>4</sub>(n=7) p=0,73 e D. vacas prenhes com dispositivo de 1,3g P<sub>4</sub> (n=5) p=0,83.

Identificou-se uma tendência ( $p=0,09$ ) de correlação positiva ( $r=0,21$ ) entre a temperatura ambiente máxima no dia da coleta de sangue (D3) com a concentração de  $P_4$  sérica em todos os animais ( $n=61$ ) (Figura 8).

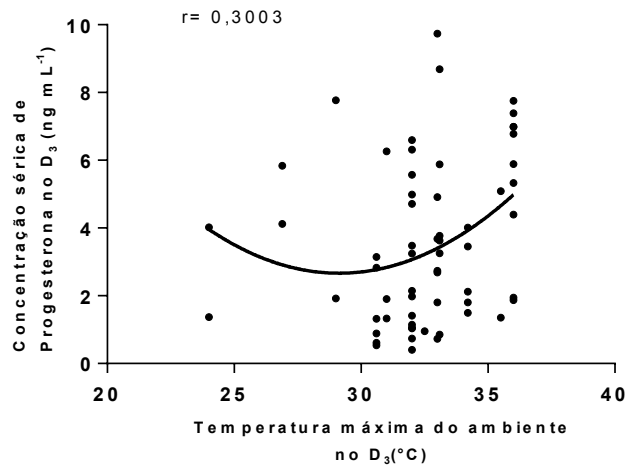


FIGURA 8 - Correlações entre temperatura ambiente máxima (°C) e concentração de  $P_4$  (ng mL<sup>-1</sup>) no terceiro dia de protocolo de IATF em todas as vacas ( $n=61$ ).

#### 6.4 Produção de leite (L) no D0 em função do dispositivo intravaginal (1,0 ou 1,3 g), gestação e temperatura.

Na Tabela 2, observa-se uma uniformidade entre os subgrupos analisados ( $p=0,64$ ), prenhes e não prenhes com seus respectivos dispositivos intravaginais (1,0g e 1,3g).

Não houve variação entre média na produção de leite nos grupos prenhes ( $22,39 \pm 5,77$  L/dia) e não prenhes ( $22,4 \pm 5,57$  L/dia),  $p=0,99$ . O mesmo foi observado entre as vacas que receberam dispositivo com 1,0g ( $23,09 \pm 5,38$  L/dia) ou 1,3g ( $21,77 \pm 5,73$  L/dia),  $p=0,26$ .

Tabela 2 - Produção de leite (em litros/dia) no dia inicial do protocolo (D0) de IATF nas vacas que ficaram prenhes e nas que não ficaram ( $p=0,99$ ), e nas vacas com dispositivos com diferente concentração de  $P_4$  (teste t não pareado,  $p=0,26$ ).

Prenhez	Conc. De $P_4$ no dispositivo (g)	Nº Vacas	Prod. Leite no D <sub>0</sub> (L)		
			Média $\pm$ DP	Máxima	Mínima
PRENHES	1	8	24 $\pm$ 2,73	28	20
	1,3	10	21,10 $\pm$ 7,28	37	13
NÃO PRENHES	1	35	22,89 $\pm$ 5,84	38	6
	1,3	38	21,95 $\pm$ 5,36	35	3

Não houve correlação ( $p=0,95$ ) entre produção de leite (L/dia) no D0 e diagnóstico de gestação (prenhes = 1 e não prenhes = 0) 30 dias após o final do protocolo de IATF (Figura 9).

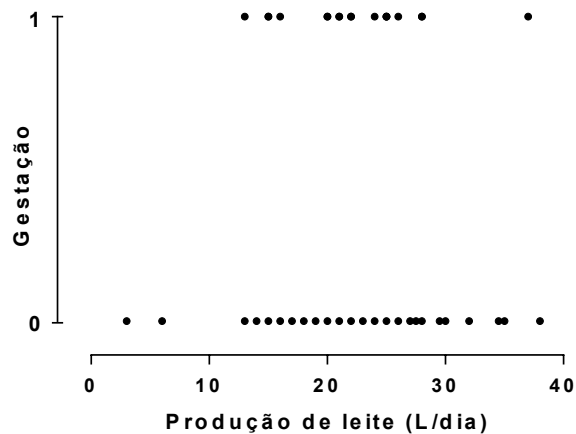


FIGURA 9- Dispersão entre produção de leite (L/dia) no D0 com prenhes (=1) e não prenhes (=0),  $n=91$ .

Não houve correlação ( $p=0,14$ ,  $r=0,15$ ) entre a temperatura máxima do ambiente e a produção de leite avaliada no dia do início do protocolo (D0) (Figura 10).

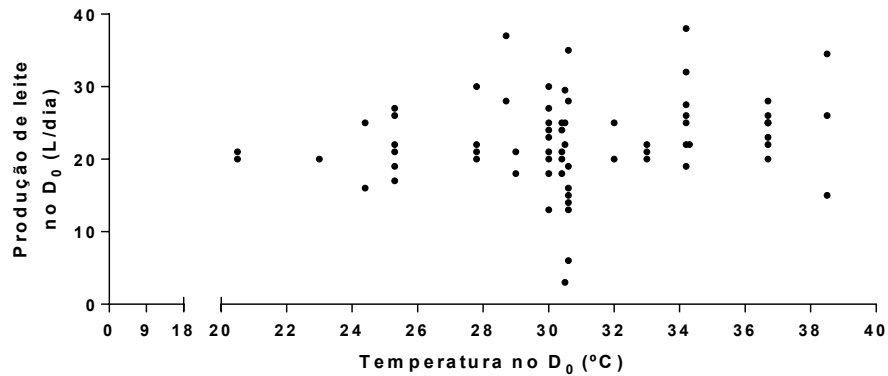


FIGURA 10- Dispersão entre temperatura máxima do ambiente (°C) com produção de leite (L) ( $p=0,14$ ,  $r =0,15$ ) no dia de início do protocolo (D0) de IATF ( $n=91$ ).

**6.5 Influência da temperatura na taxa de concepção e na probabilidade de prenhez.**

Na Figura 11 observa-se que os protocolos de sincronização foram conduzidos em períodos em que a temperatura ambiente máxima tanto no dia da IATF quanto a média da temperatura máxima nos 50 dias que precederam a IATF estavam acima da zona de conforto térmico (ZCT) para vacas leiteiras em lactação.

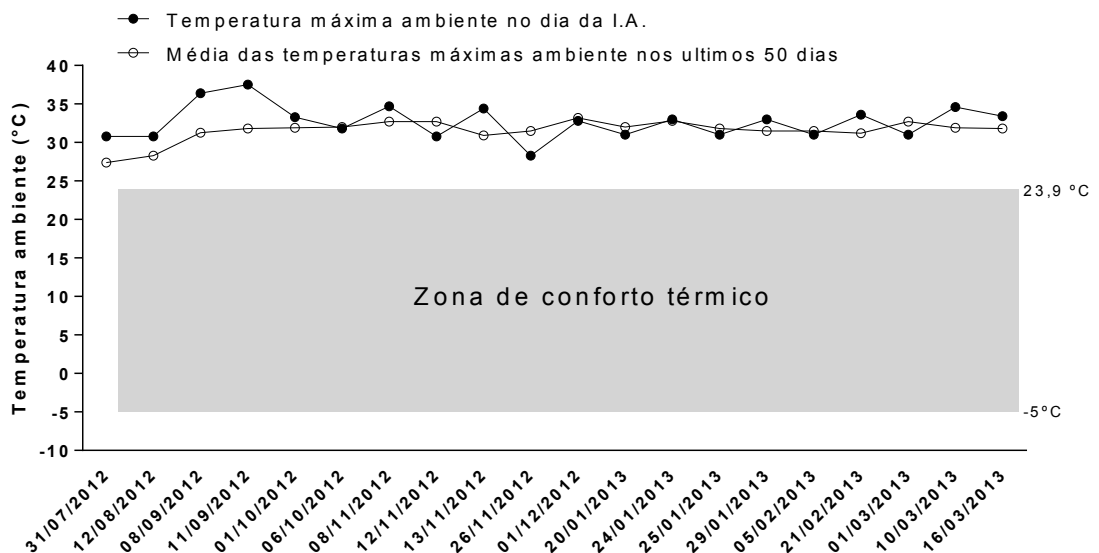


FIGURA 11- Datas em que foram realizadas as IATFs e temperatura ambiente (°C) máxima no dia da IATF e média da temperatura máxima durante os 50 dias antes a IATF.



Na Tabela 3 observa-se que as vacas não prenhes com 1,3g de P<sub>4</sub> foram expostas às temperaturas mais elevadas (média da temperatura ambiente máxima) que as vacas não prenhes com 1,0g de P<sub>4</sub> (ANOVA, p=0,008), (coletadas em um período de 50 dias antes da data de IATF). Além disso, as vacas do grupo não prenhes que receberam 1,3g de P<sub>4</sub> foram expostas a temperaturas mais elevadas que o grupo de vacas prenhes que receberam 1,3g de P<sub>4</sub>. Utilizando o teste t não pareado, não houve diferença (p=0,23) na temperatura ambiente máxima a que foram expostas as vacas prenhes (31,61±3,74°C) ou as não prenhes (31,78±3,80°C), assim como as vacas que receberam dispositivos de 1,0g (31,6±0,26°C) ou 1,3g (31,8±0,21°C).

Tabela 3 - Variação na média da temperatura ambiente (°C) máxima durante o período de foliculogênese (50 dias antes da inseminação) em que foram expostas as vacas que ficaram prenhes e as que não ficaram.

Prenhez	Conc. de P <sub>4</sub> no dispositivo (g)	Nº Vacas	Temperatura Ambiente (°C)		
			Média ±DP	Máxima	Mínima
<b>PRENHES</b>	1	8	31,81 ± 4,15 <sup>a</sup>	40,7	18,8
	1,3	10	31,45 ± 3,38 <sup>aA</sup>	40,7	18,8
<b>NÃO PRENHES</b>	1	35	31,59 ± 3,84 <sup>a</sup>	40,7	18,7
	1,3	38	31,96 ± 3,75 <sup>bB</sup>	40,7	18,7

Letras maiúsculas indicam diferença entre grupos (prenhes x não prenhes), e letras minúsculas indicam diferença dentro dos grupos prenhes ou não prenhes com diferentes dispositivos de P<sub>4</sub>.

Não houve correlação (p=0,17 e r =-0,14) entre a média da temperatura ambiente máxima no período de 50 dias que antecedem a IATF e a presença de prenhes e não prenhes (Figura 12).

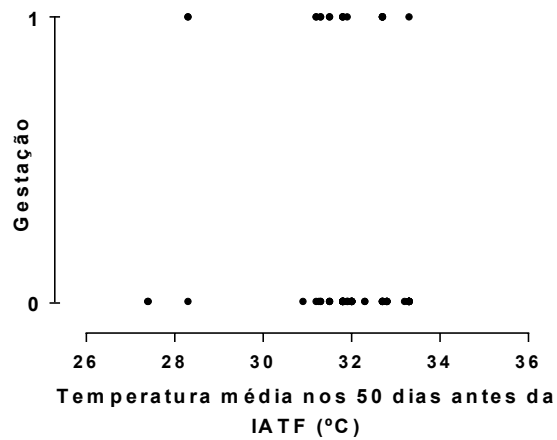


FIGURA 12 - Distribuições das prenhes (=1) e não prenhes (=0) em função da média da temperatura máxima (°C) durante 50 dias que antecedem o IATF (n=91).

A temperatura ambiente máxima interferiu na taxa de prenhez, para o aumento de um grau na média da temperatura ambiente máxima provocou a diminuição de 42,1% na chance prenhez, utilizando-se o modelo múltiplo de regressão logística (Figura 13).

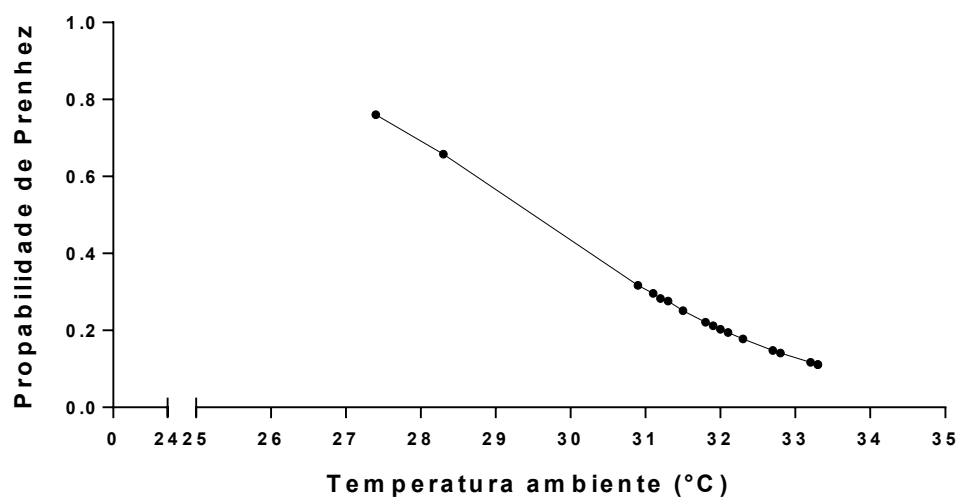


FIGURA 13 - Probabilidades de prenhez em função da média da temperatura ambiente (°C) máxima durante o período de 50 dias (período de duração da foliculogênese).

### 6.6 Dias em lactação em função da gestação e porcentagem acumulativa de prenhez:

Não houve correlação ( $p=0,68$  e  $r=0,043$ ) entre a ocorrência de prenhez (1) ou não (0) e o número de dias em lactação (DEL) em que a vaca se encontrava no início do protocolo (Figura 14).

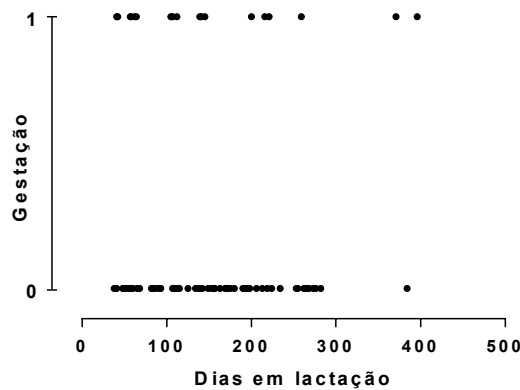


FIGURA 14–Dispersão entre dias em lactação (DEL) e diagnóstico de gestação (prenhes =1 e não prenhes = 0) em todas as vacas (n=91).

Não houve associação ( $p=0,36$ ) entre o número de vacas que foram diagnosticadas prenhes com menos de 83 dias em lactação daquelas com mais de 83 dias (Figura 15).

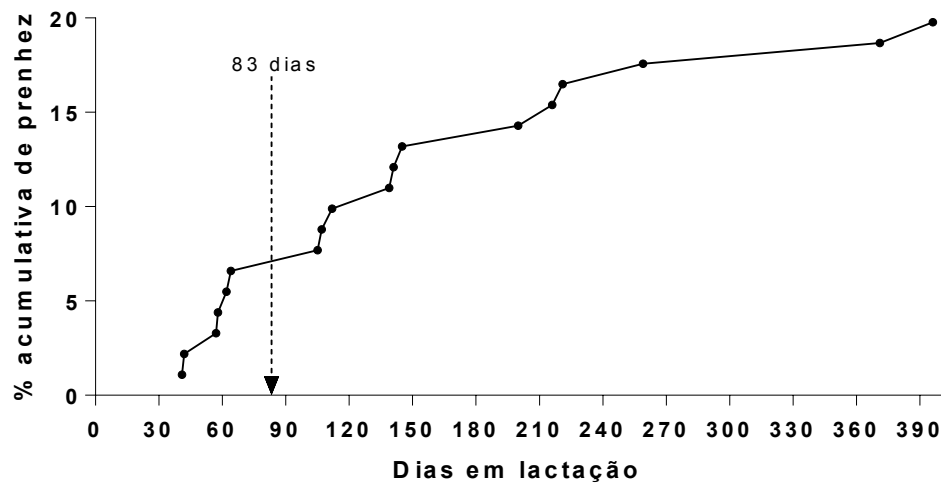


FIGURA 15 - Porcentagem acumulada de vacas prenhes (n=18) em relação aos dias em lactação.

### 6.7 Diferença entre propriedades:

Não houve diferença ( $p= 0,11$ ) no número de prenhez (prenhe=1 e não prenhe=0) entre as sete propriedades utilizadas na pesquisa (Tabela 4), utilizando ANOVA.

Tabela 4 - Distribuição do número e porcentagem de prenhez entre as propriedades utilizadas.

<b>Propriedades</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>
<b>Nº de prenhes</b>	2	4	3	4	2	3	0
<b>Nº de não prenhes</b>	3	25	7	6	2	23	7
<b>Nº de vacas</b>	5	29	10	10	4	26	7
<b>Porcentagem de prenhez</b>	40%	14%	30%	40%	50%	12%	0%

## VII DISCUSSÃO

### 7.1 Taxa de concepção

No presente estudo foi possível observar que as diferentes concentrações de  $P_4$  nos dispositivos intravaginais utilizados (1,0g ou 1,3g) não alteraram o número e a porcentagem de prenhez nas vacas de leite em lactação (Figuras 2 e 3). Conforme ilustrado na Tabela 1, não houve diferença na concentração sérica de  $P_4$  no dia 3 do protocolo de sincronização entre as vacas com diferentes dispositivos (1,0g ou 1,3g) ou entre as vacas que ficaram prenhes e as não prenhes. Há relatos de que a inserção de um único dispositivo de  $P_4$  em vacas em lactação de alta produção libera cinco vezes menos  $P_4$  do que a produção endógena em meados do diestro (CERRI et al., 2009), e que dispositivos com diferentes concentrações de  $P_4$  (1,9g, 1,56g, 1,38g e 1,0g) não produziram diferença nos valores máximos e na concentração plasmática média durante o protocolo de sincronização de ovulação em vacas da raça Holandesa em lactação (ROGAN et al., 2007). Um dos possíveis motivos para a ausência de variação na concentração plasmática de  $P_4$  entre dispositivos com diferentes doses de  $P_4$  pode ser a área de superfície de contato entre a parede da vagina e o dispositivo, que restringe a taxa de absorção de  $P_4$  (RATHBONE et al., 2002).

### 7.2 Concentração sérica de $P_4$ no D0

Neste experimento, utilizando o critério de Mann et al. (2009) no qual vacas com concentração sérica de  $P_4 \geq 2 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $n = 37$ ) apresentam corpo lúteo (CL) e concentrações  $< 2 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $n = 24$ ) tem ausência de CL, na Figura 5 não observa-se diferença no número de prenhezes entre vacas com ( $n = 5$ ) ou sem CL ( $n = 7$ ). Em protocolos de sincronização de ovulação sem a suplementação da  $P_4$  (Ovsynch), uma maior concentração de  $P_4$  plasmática durante o desenvolvimento do folículo ovulatório aumentou a fertilidade em vacas de leite (BISINOTTO et al., 2010) concordando com esta informação há relatos de que indivíduos que iniciaram protocolo Ovsynch com alta  $P_4$

(presença de corpo lúteo) tiveram maior taxa de prenhez que indivíduos sem CL (AYRES et al., 2012).

O número de vacas sem CL identificado pela concentração de  $P_4$  no terceiro dia de sincronização (D3) representou 39,3% (24/61) do total de vacas que tiveram as amostras coletadas. Indicando que as vacas poderiam estar em uma das seguintes fases ovarianas: proestro, estro ou metaestro; quando vacas iniciam o protocolo de sincronização (OVSYNCH) em uma destas fases apresentam taxa de prenhez semelhante às vacas anovulares (BISINOTTO et al., 2013). Além disso, a porcentagem de animais sem CL apresenta-se um pouco acima da média relatada na literatura (BISINOTTO et al., 2010 e STEVENSON et al., 2008), de que aproximadamente 30% das vacas de alta produção no período pós-parto são anovulares ou não apresentam corpo lúteo no início do protocolo de sincronização de ovulação, e este pode ser um dos fatores que tenha contribuído para a baixa taxa de prenhez ao final do protocolo de sincronização de ovulação.

A  $P_4$  desempenha função importante para o desenvolvimento do folículo, embrião e feto (CLEMENTE et al., 2009; MANN et al., 2003; MANN; LAMMING, 2001). Sua concentração está inversamente relacionada à frequência de pulsos de LH e as concentrações de E2 (ROBERSON et al., 1989). Dessa forma, folículos expostos a reduzidas concentrações de  $P_4$  podem ovular com tamanhos maiores do que o normal (SARTORI et al., 2004) e com oócitos que sofrem maturação nuclear precoce (REVAH; BUTLER, 1996), ocorrendo uma irregularidade da membrana nuclear, processos degenerativos de células do *cumulus* bem como alteração na forma e aglomeração das mitocôndrias, eventos que reduzem o sucesso da fertilização (INSKEEP, 2004). Embora esse oócito possa ser fertilizado, os embriões desenvolvidos sob concentrações maiores de E2 ao alcançarem a fase de 8 células apresentam um desenvolvimento anormal (BREUEL et al., 1993), podendo não chegar a 16 células (INSKEEP, 2004), resultando em uma menor taxa de prenhez por inseminação (MIHM et al., 1994).

O ambiente uterino (endométrio) também sofre alterações em condições de baixa concentração de  $P_4$ , a falta da exposição a esse hormônio pode promover a produção prematura da prostaglandina aumentando o risco de luteólise prematura comprometendo a fertilidade da vaca (CERRI et al., 2011). Em ovelhas foi estudado que a  $P_4$  controla o desenvolvimento de receptores para ocitocina e a adição da  $P_4$  exógena inibe o desenvolvimento desses receptores (LAU et al., 1992).

Considerando essas informações, neste experimento poderia ter realizado a seleção apenas de vacas com corpo lúteo no dia de início do protocolo, dessa forma o dispositivo iria suplementar a  $P_4$  endógena durante os oito dias iniciais da sincronização, já que a prostaglandina é administrada no momento da retirada do dispositivo.

A correlação entre a média da temperatura máxima e a concentração de  $P_4$  indicou uma tendência positiva, mas dentro de valores normais relatados na literatura (HENRICKS et al., 1970).

Apesar da existência de relatos de que a produção de  $P_4$  nas células luteinizadas seja menor sob condições de estresse térmico devido a um possível dano da temperatura nas células da granulosa durante a foliculogênese (WOLFENSON et al., 2002), em experimento à campo vacas de raças Holandesas e Jersey (ROMAN-PONCE, 1981) mantidas sem sombra apresentaram uma maior concentração de LH no decorrer do ciclo estral o que resultou uma maior concentração plasmática de  $P_4$  mas sem interferência no desenvolvimento ou manutenção do CL. Divergências entre concentração sérica de  $P_4$  e estresse térmico são relatadas na literatura (WISE et al., 1988).

### **7.3 Produção de leite (L) no D0**

A ausência de correlação entre a produção de leite e a concentração sérica de  $P_4$  para todos os indivíduos utilizados no experimento (Figura 6), pode estar associada à média diária de produção dos indivíduos analisados,  $22,4 \pm 5,58$  litros, e que parece não ser suficiente para aumentar a taxa metabólica e o *clearance* hepático de esteroides a ponto de diminuir as

concentrações de  $P_4$  circulante (WILTBANK et al., 2006). Todavia, ao categorizarmos os animais em função da prenhez e dos dispositivos (Figura 7), observamos que as vacas não prenhez e com dispositivos com 1,0 g apresentaram correlação negativa entre a produção de leite e concentração sérica de  $P_4$ , sendo isso explicado pela presença de indivíduos com maior produção nessa categoria (cinco vacas com produção de 30 a 38 litros). O mesmo não foi observado nas categorias, prenhes com dispositivos 1,0 g e, não prenhes e prenhes com dispositivos com 1,3 g, provavelmente por possuírem menor número de indivíduos com produção elevada e também por serem compostas por um menor número de vacas.

A não correlação entre produção de leite e a concentração sérica de  $P_4$  para todos os indivíduos pode justificar a ausência de correlação entre produção de leite e o número de prenhez aos 30 dias após IATF (Figura 9), pois supomos que a média da produção leiteira (22,4 L) não foi alta para aumentar a taxa metabólica e o *clearance* hepático de esteroides a ponto de diminuir as concentrações de  $P_4$  circulante e interferir na reprodução. Trabalhos indicam a alta produção de leite como causa, ou pelo menos associação com alterações na fisiologia reprodutiva no qual resultam em diminuição da eficiência reprodutiva (WILTBANK et al., 2006).

A produção de leite não foi influenciada pela temperatura ambiente (Figura 10), vale ressaltar que todas as propriedades incluídas no estudo têm sistema de criação a pasto sem recurso de resfriamento do animal (como ventilação, aspersão ou barracões refrigerados), ou seja, as vacas estudadas poderiam estar com uma produção de leite inferior em comparação aos meses de clima mais ameno (outono ou inverno), e que a coleta de dados representa a aferição em uma única data entre produção de leite e temperatura ambiente, não informando um histórico produtivo das vacas. St Pierre et al. (2003) em estudo para avaliar as perdas econômicas pelo estresse térmico avaliou a queda na performance (ingestão de alimentos e produção de leite) em vacas leiteiras que não recebem técnicas que diminuam o estresse térmico.



#### **7.4 Gonadotrofina coriônica eqüina (eCG):**

A ausência de eCG no protocolo de IATF utilizado neste experimento pode ter contribuído para a baixa taxa de prenhez (19,8%). Estudos que utilizaram dispositivos com as mesmas concentrações de  $P_4$  (1,0g ou 1, 3g) em vacas em lactação em anestro obtiveram taxa de prenhez que variaram de 33% a 43% na primeira inseminação pós-sincronização (SHEPHARD, 2013). A ausência do eCG no protocolo de IATF pode ter comprometido o crescimento do folículo pré ovulatório. Este hormônio possui atividade semelhante ao FSH e LH nos bovinos, (FERREIRA et al., 2013). O eCG tanto estimula a produção de E2 nas células da granulosa quanto de  $P_4$  no corpo lúteo (BARUSELLI et al., 2004). O aumento da produção de E2 folicular induzida por eCG parece estar ligado a um aumento no RNAm para o citocromo P450 17 $\alpha$  hidroxilase e de receptores de LH (SOUMANO et al., 1996; SOUMANO et al., 1998). Foi demonstrado que quando o eCG foi administrado em vacas de leite (SOUZA et al., 2009), no período final de sincronização estas apresentaram maior concentração de  $P_4$  plasmática na fase luteal subsequente. Em vacas *Bos indicus* o eCG melhorou a taxa de crescimento folicular, o diâmetro do maior folículo, a taxa de ovulação e quantidade de prenhes por inseminação (SA FILHO et al., 2010a), e em rebanhos leiteiros foi observado uma maior taxa de prenhes em vacas submetidas a protocolos de IATF (GARCIA-ISPIERTO et al., 2012, 2013; GEARY et al., 2001; SOUZA et al., 2009) a melhora da taxa de ovulação também foi observada em vacas no pós parto (ROSTAMI et al., 2011), com baixa condição de escore corporal (SOUZA et al., 2009) e em vacas que sofrem longos períodos de anestro ou estresse térmico (GARCIA-ISPIERTO et al., 2012).

Estudos indicam que o tratamento com eCG aumenta a secreção de  $P_4$ , como consequência de um efeito sobre o corpo lúteo já presente e um efeito sobre o CL subsequente já que o eCG induz a ovulação de um maior folículo no qual irá resultar na formação de um CL de maior tamanho e atividade esteroidogênica (RENSIS et al., 2004).

Levantamento de resultados particulares de protocolos de IATF (informação pessoal, dados não publicados) com o uso de eCG, em vacas de leite, no período de março de 2012 a março de 2013 resultou em uma média de 55% de prenhes, sugerindo que uma das causas da baixa taxa de prenhes no presente experimento seja consequência do protocolo empregado.

### **7.5 Temperatura ambiente (°C):**

No presente experimento foi observado que a temperatura máxima do ambiente no dia da inseminação artificial teve média de  $32,4 \pm 2,77^\circ\text{C}$  e variou entre  $28,3^\circ\text{C}$  a  $37,5^\circ\text{C}$  e, a média da temperatura máxima do ambiente durante um período de 50 dias que antecedem o IATF foi de  $31,51 \pm 1,58^\circ\text{C}$  e variou de  $27,4^\circ\text{C}$  a  $33,3^\circ\text{C}$ ; temperaturas estas acima da zona de conforto térmico para vacas da raça holandesa, estimada entre  $-5^\circ\text{C}$  a  $23,9^\circ\text{C}$  (COLLIER et al., 2014).

Berman et al. (1985) relatou que vacas de leite elevam sua temperatura corporal quando a temperatura ambiente ultrapassa os  $25^\circ\text{C}$  independente da combinação com a umidade do ar resultando em baixa ingestão de alimentos e menor produção diária.

As elevadas temperaturas ambientais que ocorreram durante o experimento colaboraram para a baixa taxa de prenhes (Figura 13), segundo Wolfenson et al. (2000) e Rensis et al. (2003) foi relatado um decréscimo de 20% a 30% na fertilidade no verão comparado aos meses de inverno. O maior efeito parece ser nos embriões que sofrem um efeito negativo das altas temperaturas mesmo antes da implantação (EALY et al. 1993; RYAN et al., 1993). Wise et al. (1988), descreveram que vacas holandesas em lactação submetidas ao estresse térmico tiveram concentrações de cortisol elevada comparadas ao respectivo controle e, que o cortisol é um inibidor da pituitária anterior que é responsável pela secreção do LH em bovinos (LI et al., 1983). Uma depressão no LH pode influenciar o desenvolvimento do corpo lúteo subsequente alterando populações das células esteroidogênicas (NISWENDER

et al., 1985), o que pode resultar em falha na sobrevivência embrionária (BIGGERS et al., 1987 e STOTT et al., 1962).

### **7.6 Dias em lactação:**

Não foi observada correlação entre dias em lactação e o diagnóstico de prenhes (1 = prenhes e 0 = não prenhes) (Figura 14). A Figura 15 indica que 33% (6/18) tornaram-se prenhes abaixo dos 83 dias em lactação, período este considerado ideal (WALSH et al., 2011) a fim de se obter um intervalo entre partos de 365 dias assumindo que sua gestação é de aproximadamente 282 dias.

O motivo dos rebanhos não terem um maior número de animais prenhes antes do intervalo dos 83 dias em lactação pode ser explicado pela soma de alguns fatores como a associação entre pico de lactação (intervalo de 4 a 8 semanas (WALSH et al., 2011), balanço energético negativo aliado aos efeitos do estresse térmico; essa soma causam efeitos de difícil mensuração (ST PIERRE et al., 2003). Foi descrito (WEST et al., 1993) que vacas que produzem mais leite (por exemplo, no pico de lactação) sofrem mais os efeitos do estresse térmico pois as vacas de maior produção tem maior atividade metabólica e produz mais calor resultando em rendimentos mais baixos e, o balanço energético negativo é agravado com o estresse térmico pois a ingestão de matéria seca é reduzida e conseqüentemente as concentrações de glicose, IGF-I e colesterol são mais baixas (SHEHAB-EL-DEEN et al., 2010) resultando em uma dificuldade maior em alcançar taxas reprodutivas eficientes em regiões tropicais e sub tropicais (WALSH et al., 2011).

## VII CONCLUSÃO

Conclui-se que a suplementação de vacas leiteiras em lactação com P<sub>4</sub> via dispositivo intravaginal (1,0g x 1,3g) durante protocolo de IATF não aumentou a taxa de prenhez com este protocolo de sincronização de ovulação nestas condições ambientais (vacas produzindo 22L/dia sob estresse térmico).

## VIII REFERÊNCIAS

AGNEW, R. E. et al. Development of maintenance requirement and energetic efficiency for lactation from production data of dairy cows. **Livestock Production Science**, v.82, n.2-3,p.151-162, 2003.

AHMAD, N. et al. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. **Biology of Reproduction**, v.52, n.5, p.1129-1135, 1995.

AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F., HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.2, p.390-396, 2002.

ANUALPEC. Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2013.

AYRES, H. et al. Double-Ovsynch in high-producing dairy cows: Effects on progesterone concentrations and ovulation to GnRH treatments. **Theriogenology**, v.79, n.1, p.159-164, 2012.

BAMBER, R. L. et al. Genetic parameters for anovulation and pregnancy loss in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.11, p.5739–5753, 2009.

BARUSELLI, P. S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, n.0, p. 479-486, 2004.

BECK, T. W. et al. Bovine serum LH, GH and prolactin following chronic implantation of ovarian steroids and subsequent ovariectomy. **Journal Animal Science**, v.42, n.2, p.461-468, 1976.

BELTRAN, M. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Conception rate in Holstein cows treated with GnRH or hCG on the fifth day post artificial insemination during

summer. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p. 580-586, 2008.

BERMAN, A. et al. Upper Critical Temperatures and Forced Ventilation Effects for High-Yielding Dairy Cows in a Subtropical Climate. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.6, p.1488-1495, 2014.

BIGGERS, B. G. et al. Effect of Heat Stress on Early Embryonic Development in the Beef Cow. **Journal of Animal Science**, v.64, n.5, p.1512-1518, 1987.

BISINOTTO, R. S. et al. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. **Journal of dairy science**, v.93, n.8, p.3578-3587, 2010.

BISINOTTO, R. S. et al. Targeted progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol. **Journal of Dairy Science**, v.96, n.4, p.2214-2225, 2013.

BLEACH, E. C. L.; GLENCROSS, R. G.; KNIGHT, P. G. Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrous cycle. **Reproduction**, v.127, n.5, p.621-629, 2004.

BREUEL, K. F. et al. Factors affecting fertility in the postpartum cow: role of the oocyte and follicle in conception rate. **Biology of Reproduction**, v.48, n.3, p.655-666, 1993.

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

CARRICK, M. J.; SHELTON, J. N. The synchronization of oestrus in cattle with progestagen-impregnated intravaginal sponges. **Reproduction**, v.14, p.21-32, 1967.

CARTMILL, J. A. et al. An alternative AI breeding protocol for dairy cows exposed to elevated ambient temperature before or after calving or both. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.4, p.799-806, 2001.

CERRI, R. L. A. et al. Duração do proestro altera a fertilidade de vacas de leite de alta produção? In. Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos, 14, 2013, Uberlândia. **Anais eletrônicos...** Uberlândia: Conapec, 2013. Disponível em: <<http://www.conapecjr.com.br/index.php>>. Acesso em: 03 de jan. 2015.

CERRI, R. L. A. et al. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.7 ,p.3352-3365, 2011

CERRI, R. L. A. et al. Progesterone concentration during follicular wave development affects follicular fluid composition and uterine release of PGF<sub>2α</sub> in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, supl. 1, p.245, 2008.

CERRI, R. L. A. et al. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. **Animal Reproduction Science**, v.110, p.56–70, 2009.

CERRI, R. L. A. et al. Timed artificial insemination with E2cyprionate or insemination at estrus in high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.11,p.3704-3715, 2004.

CHEBEL, R. C. et al. Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.11,p.4205-4219, 2006.

CLEMENTE, M. et al. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, v.138, n.3, p.507-517, 2009.

COLAZO, M. G. et al. Progesterone supplementation before timed AI increased ovulation synchrony and pregnancy per AI, and supplementation after timed AI reduced pregnancy losses in lactating dairy cows. **Theriogenology**, n.79, v.5, p.833-841, 2013.

COLLIER, R. J.; HALL, L. W.; ORTIZ, X. Estratégias para Minimizar o Estresse Térmico. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 18., 2014, Uberlândia. **Anais eletrônicos...** Uberlândia: Conapec,

2014. Disponível em: <<http://www.conapecjr.com.br/index.php>>. Acesso em: 13 de out. 2014.

CUNHA, A. P. et al. Effects of high vs. low progesterone concentrations during Ovsynch on double ovulation rate and pregnancies per AI in high producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, n.91, Suppl.1, p.246, 2008.

DAY, M. L. et al. The strategic use of E2 to enhance fertility and submission rates of progestin-based estrus synchronization programs in dairy herds. **Journal Animal Science**, v.78, n.3, p.523-529, 2000.

DENICOL, A. C. et al. Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.4, p.1794–1806, 2012.

DISKIN, M. G. et al. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, n.3-4 ,p.345-370, 2003.

EALY, A.D.; DROST, M.; HANSEN, J.P. Developmental Changes in Embryonic Resistance to Adverse Effects of Maternal Heat Stress in Cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.10, p.2899-2905, 1993.

ECHTERNKAMP, S. E. et al. Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. **Biology of Reproduction**, v.51, n.5, p.971-981, 1994.

EVANS, A. C. O. et al. Changes in androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated with the recruitment and growth of ovarian follicles during luteal phase in bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.57, n.2, p.394-401, 1997.

FERGUSON, J. D.; GALLIGAN, D. T.; THOMSEN, N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.9, p.2695-2703, 1994.

FERREIRA, R. M., et al. Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v.140, n.1, p.26-33, 2013.

- FOLMAN, Y. et al. Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. 2. Effects of progesterone and parity on conception. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.10, p.2817–2825, 1990.
- FONSECA, F. A. et al. Reproductive traits of Holsteins and Jerseys. Effectsof age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. **Journal of Dairy Science**, v.66, n.5 ,p.1128–1147,1983.
- FORTALECIMENTO DA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE. Juiz de Fora: Elizabeth Nogueira Fernandes, 04 de abril de 2013. 36 dispositivos: colorido, 25,4 x 19,05.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. E. U. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.109-126, 2004.
- FRANCO, M. et al. Effectiveness of administration of gonadotropin-releasing hormone at days 11, 14 or 15 after anticipated ovulation for increasing fertility of lactating dairy cows and non-lactating heifers. **Theriogenology**, v.66, n.4, p.945-954, 2006.
- FRIEDMAN, E. et al. Progesterone supplementation post insemination improves fertility of cooled dairy cows during the summer. **Journal of dairy science**, v.95, n.6, p.3092-3099, 2012.
- GARCIA-ISPIERTO, I. et al. A five-day progesterone plus eCG-based fixed-time AI protocol improves fertility over spontaneous estrus in high-producing dairy cows under heat stress. **The Journal of Reproduction and Devopment**, v.59 ,n.6, p. 544–548, 2013.
- GARCIA-ISPIERTO, I. et al. Reproductive performance of anoestrous high-producing dairy cows improved by adding equine chorionic gonadotrophin to a progesterone-based oestrous synchronizing protocol. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, n.5, p.752-7588, 2012.
- GARVERICK, H. A.; ZOLLERS JR., W. G.; SMITH, M. F. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. **Animal Reproduction Science**, v.28, n. 1-4, p.11-124, 1992.



- GEARY, T. W. et al. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and Co-synch protocols. **Journal Animal Science**, v.79, n.1, p.1–4, 2001.
- GINTHER, O.J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, n.6, p.1187-1194, 1996.
- GOMES, W. R.; ERB, R. E. Progesterone in bovine reproduction: A review. **Journal of Dairy Science**, v.48, n.3, p.314–330, 1965.
- GONG, J. G. et al. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early post-partum period on reproductive function in dairy cows. **Reproduction**, v.123, n.3, p.419–27, 2002.
- GREEN, M. P.; HUNTER, M. G.; MANN, G. E. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.88, n.3-4, p.179-189,2005.
- GRIMARD, B. et al. Genetic and environmental factors influencing first service conception rate and late embryonic/foetal mortality in low fertility dairy herds. **Animal Reproduction Science**, v.91, n.1-2, p.31-44, 2006.
- GÜMEN, A.; SEGUIN, B. Ovulation rate after GnRH or PTGF<sub>2α</sub> administration in early postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v.60, n.2, p. 341-348, 2003.
- GÜMEN, A.; WILTBANK, M. C. Length of progesterone exposure needed to resolve large follicle anovular condition in dairy cows. **Theriogenology**, v.63,n.1, p.202-218, 2005.
- GUZELOGLU, A. et al. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. **Animal Reproduction Science**, v.66, n.1-2, p.15-34, 2001.
- HAGEMAN, W. H.; SHOOK, G. E.; TYLER, W. J. Reproductive performance in genetic lines selected for high or average milk yield. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.12, p.4366–4376, 1991.
- HAMUDIKUWANDA, H. et al. Adipose tissue progesterone concentrations in dairy cows during late pregnancy and early lactation. **Animal Reproduction Science**, v.43, n.1, p.15–23, 1996.

- HENRICKS, D. M.; DICKEY, J. F.; NISWENDER, G. D. Serum luteinizing hormone and plasma progesterone levels during the estrous cycle and early pregnancy in cows. **Biology of Reproduction**, v.2, n.3, p. 346-351, 1970.
- HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. Applied logistic regression. New York: John Wiley & Sons, 1989.
- HOWELL, J. L.; FUQUAY, J. W.; SMITH, A. E. Corpus luteum growth and function in lactating Holstein cows during spring and summer. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.3, p.735-739, 1994.
- INSKEEP, E. K. Preovulatory, postovulatory, and post maternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. **Journal of Animal Science**, v.82, n.13 suppl, p.E24-E39. 2004.
- INSKEEP, E. K.; DAILEY, R. A. Embryonic death in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practic.**, v.21, n.2, p.437-461, 2005.
- IRELAND, I. J.; ROCHE J. F. Effects of progesterone on basal LH and episodic LH and FSH secretion in heifers. **Journal Reproduction and Fertility**, v.64, n.2, p.295-302, 1982.
- JOHNSON, D. E.; JOHNSON, K. A.; BALDWIN, R. L. Changes in liver and gastrointestinal tract energy demands in response to physiological workload in ruminants. **The journal of nutrition**, v.120, n.6, p.649-655, 1990.
- JONSSON, N. N. et al. Relationships among calving season, heat load, energy balance and postpartum ovulation of dairy cows in a subtropical environment. **Animal Reproduction Science**, v.47, n.4, p.315-326, 1997.
- LARSON, S. F.; BUTLER, W. R.; CURRIE, W. B. Reduced fertility associated with low progesterone post breeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.7, p.1288-1295,1997.
- LAU, T. M.; GOW, C. B.; FAIRCLOUGH R. J. Differential effects of progesterone treatment on the oxytocin-induce prostaglandin F2 alpha response and the levels of endometrial oxytocin receptors in ovariectomized ewes. **Biology of Reproduction**, v.46, n.1, p.17-22, 1992.

- LEROY J. L. et al. Non-sterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. **Reproduction**, v.130, n.4, p.485-495, 2005.
- LI, P. S. E.; WAGNER, W. C. In vivo and in vitro studies on the effect of adrenocorticotrop hormone or cortisol on the pituitary response to gonadotropin releasing hormone. **Biology of Reproduction**, v.29, n.1, p.25-37, 1983.
- LIMA, J. R.; RIVERA F. A. et al. Effect of increasing amounts of supplemental progesterone in a timed artificial insemination protocol on fertility of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.11, p.5436-5446, 2009.
- LOPES, A. S. Relationship of pre-ovulatory follicle size, E2 concentration and season to pregnancy outcome in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.99, n.1-2, p. 34-43, 2007.
- LOPEZ, H.; CARAVIELLO, D. Z. et al. Relationship Between Level of Milk Production and Multiple Ovulations in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.8, p.2783-2793, 2005.
- LOPEZ, H., SATTER, L. D. et al. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.81, n.3-4, p.209-223, 2004.
- LOPEZ-GATIUS, F. The effects of GnRH treatment at the time of AI and 12 days later on reproductive performance of high producing dairy cows during the warm season in northeastern Spain. **Theriogenology**, v.65, n.4, p.820-830, 2006.
- LUCY, M. C. Effects of somatotropin on the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, n.1, p.73-82, 1995.
- LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal of Dairy Science**, v.84, n.6, p. 1277-1293, 2001.
- MANN, G. E. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. **Animal Reproduction Science**, v.115, n.1, p. 296-299, 2009.

- MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.34, p.269–274, 1999.
- MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v.121, n.1, p.175-180, 2001.
- MANN, G. E.; FRAY, M. D.; LAMMING, G. E. Effects of timed of progesterone supplementation on embryo development and interferon-  $\gamma$  production in the cow. **The Veterinary Journal**, v.171, n.3, p.500-503, 2006.
- MANN, G. E.; GREEN, M. P. et al. Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v.79, n.1, p.71-79, 2014.
- MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, v.79, n.2, p.263-323, 1999.
- MCLEOD, K. R.; BALDWIN, R. L. Effects of diet forage: concentrate ratio and metabolizable energy intake on isolated rumen epithelial cell metabolism in vitro. **Journal Animal Science**, v.78, n.3, p.771-783, 2000.
- MIHM, M.; BAGUISI, A. et al. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.102, n.1, p.123-130, 1994.
- MILLER, W. R. Conjugation, distribution, and biological half-life ( $t_{1/2}$ ) of radioactive progesterone in plasma and red cells of bovine blood. **Journal of Dairy Science**, v.46, n.13, p.1402–1404, 1963.
- NISWENDER, G. D. et al. Regulation of luteal function in domestic ruminants: new concepts. **Recent Progress in Hormone Research**, v.41, n.101, p.51, 1985.
- OPSOMER, G. et al. An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. **Reproduction in Domestic Animals**, v.204, n. 33, p.193–204, 1998.

- PULLEY, S. L.; WALLACE, L. D. et al. Ovarian characteristics, serum concentrations of progesterone and E2, and fertility in lactating dairy cows in response to equine chorionic gonadotropin. **Theriogenology**, v.79, n.1, p.127-134, 2013.
- PURSLEY, J. R.; MARTINS, J. P. Impact of circulating concentrations of progesterone and antral age of the ovulatory follicle on fertility of high-producing lactating dairy cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, n.1, p.267–71, 2012.
- PURSLEY, J. R. et al. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.2, p.295–300, 1997.
- PUTNEY, D. J. et al. Heat stress-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. **Biology of Reproduction**, v.39, n.3, p.717-728, 1988.
- QUIRK, S. M.; HARMAN, R. M.; CORWAN, R. G. Regulation of fas antigen (Fas,CD95) – mediated apoptosis of bovine granulosa cells by serum and growth factors. **Biology of Reproduction**, v.63, n.5, p.1278-1284, 2000.
- RABIEE, A. R.; MACMILLAN, K. L.; SCHWARZENBERGER, F. Progesterone metabolism in ovariectomised non-lactating Holstein-Friesian cows treated with progesterone with two levels of feed intake. **Animal Reproduction Science**, v.66, n.1-2, p.35–46, 2001.
- RAHE, C. H. et al. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the estrous cycle. **Endocrinology**, v.107, n.2, p.498-503, 1980.
- RATHBONE, M. J. et al. Reengineering of a commercially available bovine intravaginal insert (CIDR insert) containing progesterone. **Journal of Controlled Release**, v.85, n.1-3, p.105-115, 2002.
- RENSIS, F. D.; LOPEZ-GATIUS, F. Use of equine chorionic gonadotropin to Control Reproduction of the Dairy Cow: A Review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, n.2, p.177-182, 2014.

- RENSIS, F. D.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - a review. **Theriogenology**, v.60, n.6, p.1139-1151, 2003.
- REVAH, I.; BUTLER, W. R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, n.1, p.39-47, 1996.
- RIVERA, F. A. et al. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. **Reproduction**, v.141, n.3, p.333-342, 2011.
- RIVERA, G. M.; FORTUNE, J. E. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. **Endocrinology**, v.144, n.2, p.437-446, 2003.
- ROBERSON, M. S. et al. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biology of Reproduction**, v.41, n.6, p.997-1003, 1989.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. et al. Reproductive Performance in High-producing Dairy Cows: Can We Sustain it Under Current Practice? **Reviews in Veterinary Medicine, I.V.I.S.** R0108.1208, 2008.
- ROGAN D, M. M. et al. Progesterone release patterns from Cue-Mate in comparison to other intravaginal progesterone-releasing devices in lactating dairy cows. **Reproduction Fertility and Development**, v.19, p.126-7, 2007.
- ROMAN-PONCE, H.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Hormonal interrelationships and physiological responses of lactating dairy cows to a shade management system in a subtropical environment. **Theriogenology**, v.16, n.2, p.139-154, 1981.
- ROSENBERG, M. et al. Comparison of methods for synchronization of oestrous cycles in dairy cows: 1. Effect on plasma progesterone and manifestation of estrus. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.10, p.2807-2816, 1990.

- ROSTAMI, B. et al. Effect of eCG on early resumption of ovarian activity in postpartum dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.128, n.1-4, p. 100-106, 2011.
- ROTH, Z. et al. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. **Reproduction**, v.121, n.5, p.745-751, 2001.
- ROTH, Z.; MEIDAN, R. et al. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.120, n.1, p.83-90, 2000.
- ROYAL, M. D. et al. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. **Animal Science**, v.70, p.487-501, 2000.
- RYAN, D. P.; BOLAND, M. P. Frequency of twin births among Holstein-Friesian cows in a warm dry climate. **Theriogenology**, v.36, n.1, p.1-10, 1991.
- RYAN, D. P. et al. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. **Theriogenology**, v.39, n.3, p.719-737. 1993.
- SÁ FILHO, O. G. Fixed-time artificial insemination with E2 and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v.72, n.2, p.210-218, 2009.
- SÁ FILHO, O. G.; VASCONCELOS, J. L. M. Treatments to Optimize the Use of Artificial Insemination and Reproductive Efficiency in Beef Cattle under Tropical Environments. **Veterinary Medicine International**, v.2011, p.1-10, 2010.
- SAINZ, R. D.; BENTLEY, B. E. Visceral organ mass and cellularity in growth-restricted and refeed beef steers. **Journal Animal Science**, v.75, n.5, p.1229-1236, 1997.
- SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D. K. et al. High Feed Intake Increases Liver Blood Flow and Metabolism of Progesterone and E2-17 $\beta$  in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.11, p.2831-2842, 2002.
- SANTOS, J. E. P. et al. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.513-35, 2004.

- SANTOS, J. E. P. et al. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. **Journal Animal Science**, v.79, n.11, p.2881-2894, 2001.
- SARTORI, R.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating cows and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.11, p.2813–2822, 2002.
- SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M. et al. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.4, p.905-920, 2004.
- SAVIO, J. D. et al. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, n.1, p.77-84, 1993.
- SCANLON, P. F.; SREENAN, J.; GORDON, I. Synchronization of oestrus in heifers by intravaginal application of progesterone. **The Veterinary Record**, v.90, n.16, p.440–44, 1972.
- SCHMITT, E. J. et al. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. **Journal of Animal Science**, v.74, n.5, p.1074-1083, 1996.
- SHEHAB-EL-DEEN, M. A. et al. Biochemical changes in the follicular fluid of the dominant follicle of high producing dairy cows exposed to heat stress early post-partum. **Animal Reproduction Science**, v.117, n.3-4, p.189-200, 2010.
- SHELDON, I. M. et al. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v.65, n.8, p.1516-1530, 2006.
- SHEPHARD, R. W. Efficacy of inclusion of equine chorionic gonadotrophin into a treatment protocol for anoestrous dairy cows. **New Zealand Veterinary Journal**, v.61, n.6, p.330-336, 2013.
- SOUMANO, K.; LUSSIER, J. G. et al. Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine



- chorionic gonadotrophin versus FSH. **Journal of Endocrinology**, v.156, n.2, p.373-378, 1998.
- SOUMANO, K.; SILVERSIDES, D. W. et al. Follicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochromes P450 17 alpha-hydroxylase and aromatase messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. **Biology of Reproduction**, v.55, n.6, p.1419-1426, 1996.
- SOUZA, A. H. et al. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cow. **Theriogenology**, v.72, n.1, p.10-21, 2009.
- SOUZA, A. H. et al. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.70, n.2, p.208-215, 2008.
- SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.5, n.2, p.49, 2004.
- SPENCER, T. E.; SANDRA, O.; WOLF, E. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. **Reproduction**, v.135, n.2, p.165-179, 2008.
- SPICER, L. J. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. **Biology of Reproduction**, v.70, n.5, p.1223-1230, 2004.
- STEVENSON, J. S. et al. Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. **Journal of Dairy Science**, v.91, n.7, p.2901-2915, 2008.
- STEVENSON, J. S.; PURSLEY, J. R., et al. Treatment of Cycling and Noncycling Lactating Dairy Cows with Progesterone During Ovsynch. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.7, p.2567-2578, 2006.
- STOTT, G. H.; WILLIAMS, R. J. Causes of Low Breeding Efficiency in Dairy Cattle Associated with Seasonal High Temperatures. **Journal of Dairy Science**, v.45, n.11, p.1369-1375, 1962.

- ST-PIERRE, N. R. et al. Economic Losses from Heat Stress by US Livestock Industries<sup>1</sup>. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.E52-E77, 2003.
- STRONGE, A. J. H. et al. Post insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. **Theriogenology**, v.64, n.5, p.1212-1224, 2005.
- TROUT, J. P.; MCDOWELL, L. R.; HANSEN, P. J. Characteristics of the estrous cycle and antioxidant status of lactating Holstein cows exposed to heat stress. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.5, p.1244-1250, 1998.
- TURINO, L. N. et al. Pharmacokinetics of progesterone in lactating dairy cows: Gaining some insights into the metabolism from kinetic modeling. **Journal of dairy science**, v.93, n.3, p.988-999, 2010.
- ULBERG, L. D.; BURFENING, P. J. Embryo death resulting from adverse environment on spermatozoa or ova. **Journal of Animal Science**, v.26, n.3, p.571-577, 1967.
- VANHOLDER; T. et al. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation *in vitro*. **Animal Reproduction of Science**, v.87, n.1-2, p.33-44, 2005.
- VASCONCELOS, J. L. M. et al. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v.56, n.2, p.307-314, 2001.
- 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, n.4, p.325-342, 2008.
- WALSH, R. B. et al. The effect of a progesterone releasing intravaginal device (PRID) on pregnancy risk to fixed-time insemination following diagnosis of non-pregnancy in dairy cows. **Theriogenology**, v.67, n.5, p.948-956, 2007.
- WALSH, S. W. et al. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.123, n.3-4, p.127-138, 2011.

- WALSH, R.B., et al. Synchronization of estrus and pregnancy risk in anestrous dairy cows after treatment with a progesterone-releasing intravaginal device. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.3, p.1139–1148, 2007.
- WASHBURN, S. P. et al. Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.1, p.244-251, 2002.
- WASIELAK, M.; BOGACKI, M. Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-I during in vitro maturation of bovine oocytes. **The Journal of reproduction and development**, v.53, n.2, p.419-426, 2007.
- WEST, J. W. Interactions of Energy and Bovine Somatotropin with Heat Stress. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.7, p.2091-2102, 1993.
- WHERMAN, M.E. et al. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 beta-estradiol and increases conception in cows. **Biology of Reproduction**, v.49, n.2, p.214-220, 1993.
- WILLARD, S. et al. The effects of GnRH administration post-insemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. **Theriogenology**, v.59, n.8, p.1799-1810, 2003.
- WILLIAMS, W. F. Excretion of progesterone and its metabolites in milk, urine, and feces. **Journal of Dairy Science**, v.45, n.12, p.1541-1542, 1962.
- WILSON, S. J. et al. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.8, p.2124-2131, 1998.
- WILTBANK, J. N.; KASSON, C. W. Synchronization of estrus in cattle with an oral progestation agent and an injection of an estrogen. **Journal of Animal Science**, v. 27, n.1, p.113-116, 1968.
- WILTBANK, M. C.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.21-52, 2002.

- WILTBANK, M. C. et al. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.12, p.2998-3007, 2000.
- WILTBANK, M. C. et al. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v.65, n.1, p.17-29, 2006.
- WILTBANK, M. C. et al. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.76, n.9, p.1568-1582, 2011.
- WISE, M. E. et al. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.9, p.2480-2485, 1988.
- WOLFENSON, D. et al. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v.62, n.6, p.1042-1055, 2004.
- WOLFENSON, D. et al. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, n.2, p.535-547, 2000.
- WOLFENSON, D. et al. Seasonal differences in progesterone production by luteinized bovine thecal and granulosa cells. **Domestic Animal Endocrinology**, v.22, n.2, p.81-90, 2002.
- WOLFENSON, D. et al. Secretion of PGF<sub>2α</sub> and oxytocin during hyperthermia in cyclic and pregnant heifers. **Theriogenology**, v. 39, n.5, p.1129-1141, 1993.
- YANIZ, J. L.; MURUGAVEL, K.; LOPEZ-GATIUS, F. Recent developments in oestrous synchronization of post-partum dairy cows with or without ovarian disorders. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, n.2, p.86-93, 2004.
- ZOLLERS, W. G. et al. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrus cycle. **Reproduction**, v.97, p.329-337, 1993.
- ZULU, V. C.; NAKAO, T.; SAWAMUKAI, Y. Insulin-like growth factor-I as a possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.64, n.8, p.657-665, 2002.