**UNESP** **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

FMVZ – BOTUCATU – FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

# ESTRATÉGIAS PARA AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO FOLÍCULO OVULATÓRIO EM VACAS HOLANDESAS EM LACTAÇÃO SUBMETIDAS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

**JOÃO PEDRO DE ALBUQUERQUE**

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

BOTUCATU – SP

DEZEMBRO - 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

# ESTRATÉGIAS PARA AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO FOLÍCULO OVULATÓRIO EM VACAS HOLANDESAS EM LACTAÇÃO SUBMETIDAS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

JOÃO PEDRO DE ALBUQUERQUE

Médico Veterinário

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

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

BOTUCATU – SP

DEZEMBRO - 2015

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

Albuquerque, João Pedro de, 1987-
A345e Estratégias para aumento da concentração de progesterona durante o desenvolvimento do folículo ovulatório em vacas holandesas em lactação submetidas à inseminação artificial em tempo fixo / João Pedro de Albuquerque. – Botucatu: [s.n.], 2015
ix, 56 f. : grafs., ils., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2015
Orientador: José Luiz Moraes Vasconcelos
Inclui bibliografia

1. Bovino – Reprodução. 2. Bovino – Inseminação artificial. 3. Progesterona. I. Vasconcelos, José Luiz Moraes. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

# BIOGRAFIA DO AUTOR

**JOÃO PEDRO DE ALBUQUERQUE** nascido no município de São Pedro/SP, em 10 de Julho de 1987, filho de João Luis de Albuquerque e Maria Madalena da Silva Albuquerque. Possui Graduação em Medicina Veterinária pela FMVZ-UNESP/Botucatu (2012).

Em 2013 ingressou no Programa de Mestrado da Zootecnia pela FMVZ-UNESP/Botucatu, tendo defendido sua dissertação em Dezembro de 2015, sob a orientação do Professor Assistente Doutor José Luiz Moraes Vasconcelos, sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES. Durante o Mestrado desenvolveu o trabalho intitulado ESTRATÉGIAS PARA AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO FOLÍCULO OVULATÓRIO EM VACAS HOLANDESAS EM LACTAÇÃO SUBMETIDAS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO.

# DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João Luis de Albuquerque e Maria Madalena da Silva Albuquerque, meu muito obrigado. Sem vocês eu não conseguiria.

## AGRADECIMENTOS

A minha família, pela base que me proporcionou.

Aos meus companheiros de Mestrado pelos ensinamentos e companheirismo.

Ao meu orientador Zequinha, por todos ensinamentos e paciência.

A FMVZ-UNESP/Botucatu, pela minha formação.

Aos membros da Conapec Jr, pela ajuda nos experimentos.

A Fazenda Colorado, por ceder instalações e animais para realização dos experimentos.

Aos funcionários da sessão de Pós-Graduação da UNESP – Botucatu: Seila e Aline; Departamento de Produção Animal: Renato e José Luis Barbosa, pela disposição e paciência.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Adjunto João Carlos Pinheiro Ferreira e Prof. Adjunto José Buratini Junior, pelas sugestões e críticas que contribuíram para melhoria da dissertação.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Associado (Livre Docente) Mario Binelli e Prof. Adjunto João Carlos Pinheiro Ferreira dos Santos, pelas sugestões e críticas que contribuíram para melhoria da dissertação.

A empresa Zoetis pelo apoio durante a realização do projeto.

# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....vii
SUMÁRIO DE TABELAS .....viii
SUMÁRIO DE FIGURAS ..... ix
CAPÍTULO 1 ..... 1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS ..... 1
1. INTRODUÇÃO ..... 2
2. REVISÃO DE LITERATURA ..... 3
2.1.Importância dos hormônios esteroides (E2 e P4) na fertilidade ..... 3
2.2. Diferenças na fertilidade entre primíparas e multíparas ..... 10
2.3. Distintos protocolos de IATF ..... 11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 13
CAPÍTULO 2 ..... 23
RESUMO ..... 24
ABSTRACT ..... 26
1. INTRODUÇÃO ..... 28
2. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 31
3. RESULTADOS ..... 35
4. DISCUSSÃO ..... 41
5. CONCLUSÕES ..... 46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 47
CAPÍTULO 3 ..... 55
CONSIDERAÇÕES GERAIS E IMPLICAÇÕES ..... 56

## LISTA DE ABREVIATURAS

P4- Progesterona

BE – Benzoato de Estradiol

CL – Corpo Lúteo

CIDR – Implante intravaginal de progesterona

E2 – Estradiol

eCG – Gonadotrofina Coriônica equina

ECP – Cipionato de Estradiol

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina

IA – Inseminação Artificial

TE- Transferência de embrião

IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo

TETF- Transferência de embrião em tempo fixo

IGF-1 – Insulin like Growth Factor 1 (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1)

LH – Hormônio Luteinizante

LHR – Receptor de Hormônio Luteinizante

PGFM- 3, 14-DIIDRO 15-CETO PROSTAGLANDINA F2´ALFA'

PGF2α – Prostaglandina

RNAm – RNA mensageiro

RT-PCR – Reverse Trascriptase Polymerase Chain Reaction

Sg – Colheita de sangue

US – Ultrassom

ECC- Escore de condição corporal

P/IA- Prenhez por IA

IMS- Ingestão de matéria seca

DEL- Dias em lactação

## SUMÁRIO DE TABELAS

**Página**

Tabela 1 ..... 35
Características dos animais no início do protocolo.

Tabela 2 ..... 36
Concentração de P4 por tratamento

Tabela 3 ..... 37
Interação entre presença de CL no d-11 e tratamento na concentração de P4 no dia da 1ª Prostaglandina

Tabela 4 ..... 37
Efeito de tratamento na P/IA em ambos diagnósticos de gestação e nas perdas gestacionais

Tabela 5 ..... 38
Tendência de interação (P=0,06) entre P4 no d-4 e paridade na P/IA

Tabela 6 ..... 38
Tendência de interação (P=0,06) entre P4 no d-4 e paridade na P/IA aos 60d

Tabela 7 ..... 39
Interação (P=0,04) entre P4 no d-4 e paridade na P/IA aos 32d (somente animais que apresentaram cio estão incluídos na análise estatística)

Tabela 8 ..... 39
Interação (P=0,01) entre P4 no d-4 e paridade na P/IA aos 60d (somente animais que apresentaram cio estão incluídos na análise estatística)

## SUMÁRIO DE FIGURAS

**Página**

Figura 1 ..... 32
Esquema dos dois grupos experimentais

Figura 2 ..... 34
Esquematização de colheitas de sangue, utilização de US, e detecção de cio

Figura 3 ..... 40
Probabilidade de prenhez aos 32d por concentração de P4 no d-4 em primíparas e multíparas

Figura 4 ..... 40
Probabilidade de prenhez aos 60d por concentração de P4 no d-4 em primíparas e multíparas

Figura 5 ..... 41
Probabilidade de prenhez no d60 por concentração de P4 após a IA

# CAPÍTULO 1

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

# 1. INTRODUÇÃO

Um dos principais motivos que levam à baixa produtividade leiteira é a baixa eficiência reprodutiva, que é observada principalmente devido às baixas taxas de prenhez e insatisfatória sobrevivência embrionária (SANTOS et al., 2004). Portanto um caminho para aumento da produtividade seria via aumento da P/IA e diminuição das perdas gestacionais em vacas leiteiras especializadas. Porém é sabido que vacas Holandesas em lactação apresentam reduzida fertilidade (LUCY, 2001; SANTOS et al., 2004), provavelmente devido a diversos fatores, sendo um deles as baixas concentrações sanguíneas de P4 (WILTBANK et al., 2006). O decréscimo na circulação sanguínea de P4 em vacas leiteiras em lactação pode ser associado com algumas respostas que são deletérias à fertilidade dos animais. Dentre essas respostas estão o aumento da incidência de luteólise prematura no ciclo estral subsequente à baixa exposição à P4 (CERRI et al., 2011b; SILVIA et al., 1991; SHAHAM-ALBALANCY et al., 2001; GARVERICK et al., 1992; ZOLLERS et al., 1993), aumento na liberação de pulsos de LH e consequente maturação precoce do oócito (INSKEEP, 2004), aumento da incidência de duplas ovulações (HAYASHI et al., 2008). Sabe-se também que existem diversos fatores que estão associados a bons índices de fertilidade em vacas leiteiras em lactação, como elevadas concentrações de P4 no momento da aplicação de PGF2α (BISINOTTO et al., 2010b; PEREIRA et al., 2013a), baixas concentrações de P4 próxima a IA (MARTINS et al., 2011; GIORDANO et al., 2012b; PEREIRA et al., 2013b), aumento das concentrações de E2 durante o proestro (CERRI et al., 2004), e aumento na concentração de P4 após a IA (DEMETRIO et al., 2007; LONERGAN et al., 2011).

A IATF é uma ferramenta que possibilita a IA nos animais sem a detecção de estro (PURSLEY et al., 1997a), e protocolos atuais se mostram eficientes em aumentar a fertilidade, pelo fato de elevarem a submissão à IA sem reduzir a P/IA se comparado com a IA após detecção de cio ou com a monta natural (SANTOS et al., 2009; LIMA et al., 2012). Na verdade, programas de sincronização de estro podem aumentar a P/IA, exatamente por maximizarem a submissão dos animais à IA (TENHAGEN et al., 2004). Os benefícios vão ainda além, pois através do uso da IATF é possível manipular o ambiente hormonal das vacas do rebanho que são

potencialmente menos férteis, fazendo com que a fertilidade seja maximizada em comparação com manejos reprodutivos tradicionais (BISINOTTO et al., 2013). A manipulação da P4 durante o crescimento do folículo ovulatório em protocolos de IATF, por exemplo, é uma ferramenta que vem sendo estudada durante todo este século, porém mostrando resultados variáveis.

Diferentes protocolos são amplamente utilizados em diversas partes do mundo. Nos Estados Unidos por exemplo, onde a utilização de E2 é proibida, protocolos são baseados na aplicação de GnRH tanto visando o recrutamento de uma nova onda folicular como a ovulação do folículo dominante. No Brasil, onde não há restrições para o uso de E2, protocolos à base de E2 e P4 são largamente utilizados, visto que já foi demonstrado que a utilização do protocolo 5d-Cosynch (à base de GnRH) apresenta menor fertilidade em nossas condições ambientais, apesar deste protocolo aumentar a concentração de P4 no dia da PGF2α e a taxa de sincronização dos animais (PEREIRA et al., 2013a). Interessantemente, Pereira et al., 2015 demonstraram que ao se adicionar uma aplicação de GnRH no início de um protocolo à base de E2 e P4, há aumento da fertilidade dos animais nos dias 32 (sem GnRH =30,0% vs. com GnRH= 37,3%) e 60 após a IA (sem GnRH= 25,1% vs. com GnRH= 31,0%).

O presente estudo teve por objetivo suplementar com P4 exógena os animais durante um protocolo de sincronização de estro a base de E2 e P4 com uma aplicação de GnRH em seu início, visando aumentar a concentração de P4 no momento da aplicação de PGF2α.

A hipótese é de que os animais com maior concentração de P4 durante o desenvolvimento do folículo ovulatório terão maior fertilidade.

# 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1. Importância dos hormônios esteróides (P4 e E2) na fertilidade

Existem diversos fatores que podem reduzir a fertilidade de vacas leiteiras em lactação submetidas a IATF, como a ciclicidade, a fase do ciclo estral em que os animais são submetidos ao protocolo de sincronização de cio, e a categoria animal.

Por exemplo, sabe-se que animais anovulares submetidos a 1ª IA pós parto apresentam menor fertilidade, tendo menor P/IA (SANTOS et al., 2009) e maior taxa de perda gestacional (SANTOS et al., 2004; STEVENSON et al., 2006). Ainda, vacas sem CL no início da sincronização, sendo estas anovulares ou mesmo vacas cíclicas que não estão no diestro, apresentam menor probabilidade de emprenharem em comparação a animais que apresentam CL (BISINOTTO et al., 2010a, 2013, 2015b; DENICOL et al., 2012). Com relação a categoria animal, vários estudos reportaram que primíparas geralmente apresentam maior fertilidade comparadas a multíparas, quando esses animais são inseminados após um protocolo de IATF que proporciona bons índices de sincronização da ovulação (BRUSVEEN et al., 2008; SOUZA et al., 2008; GIORDANO et al., 2012b).

Dentre estes fatores que interferem na fertilidade de fêmeas bovinas leiteiras, podemos destacar também a concentração inadequada dos hormônios esteróides (P4 e E2). As concentrações circulantes de P4 são determinadas pelo balanço entre sua produção, que ocorre principalmente pelo CL, e a sua metabolização, que ocorre principalmente no fígado (WILTBANK et al., 2014). Esta metabolização de P4 é regulada primariamente pelas mudanças no fluxo sanguíneo hepático (WILTBANK et al., 2006). Com relação ao E2, sabe-se que as concentrações de P4 durante o desenvolvimento do folículo ovulatório afeta a concentração de E2 durante o proestro (CERRI et al., 2011a). CERRI et. al. 2011b demonstraram também que quando há menor P4 durante o desenvolvimento do folículo ovulatório há alteração na expressão de receptores-α de E2 no endométrio, podendo prejudicar a atuação do hormônio no ambiente uterino. Portanto a baixa P4 durante a fase de desenvolvimento folicular afeta negativamente a fase do proestro, limitando a função do E2 durante este período. De fato a concentração de esteroides afeta a fertilidade de vacas leiteiras em lactação, visto que esses animais apresentam menores concentrações circulantes de P4 (ainda, apresentam menores concentrações de E2) em comparação a vacas secas e novilhas leiteiras (SARTORI et al., 2004; WILTBANK et al., 2006), o que pode estar associado ao aumento do fluxo sanguíneo no fígado, e consequentemente, maior metabolização hepática desses hormônios esteróides (VASCONCELOS et al., 2003; SANGSRITAVONG et al., 2002).

As baixas concentrações de P4 durante o desenvolvimento do folículo dominante pode resultar em aumento da incidência de ciclos curtos no ciclo estral subsequente (CERRI et al., 2011b; SILVIA et al., 1991; SHAHAM-ALBALANCY et al., 2001; GARVERICK et al., 1992; ZOLLERS et al., 1993), aumento na liberação de pulsos de LH e consequente maturação precoce do oócito (INSKEEP, 2004), aumento da incidência de duplas ovulações (HAYASHI et al., 2008).

Diversos relatos demonstram que a concentração de P4 influencia na liberação hipofisária de LH (VASCONCELOS et al., 2003; ROBERSON et al., 1989; SAVIO et al., 1993; CERRI et al., 2011b; INSKEEP, 2004), sendo os dois parâmetros inversamente relacionados (ROBERSON et al., 1989). Além das vacas leiteiras, este mecanismo ocorre também em vacas de corte, como observaram FIKE et al., 2004, ao verificarem que a pulsatilidade de LH diminuia em resposta ao aumento de P4 alcançado pela suplementação exógena através de dispositivos intravaginais. A relação entre P4 e pulsatilidade de LH tem efeito direto principalmente na dinâmica folicular (CERRI et al., 2011b; SAVIO et al., 1993; INSKEEP, 2004), visto que em baixa concentração de P4 ocorre aumento do diâmetro folicular (CERRI et.al., 2011a; CERRI et.al., 2011b; SARTORI et al., 2004), há maior produção folicular de E2, e menor concentração intrafolicular de IGF total (CERRI et al., 2011b). Um dos efeitos mais deletérios à fertilidade porém podem estar relacionados com a qualidade do oócito quando super estimulado precocemente. Um incremente nas concentrações de LH é associado com maturação precoce do oócito, que é caracterizada pelo recomeço da meiose e quebra da vesícula germinativa (REVAH & BUTLER, 1996). Este mecanismo leva a redução na P/IA (MIHM et al., 1994) pois afeta a qualidade embrionária (AHMAD et al., 1995; CERRI et al., 2009), e pode servir de explicação para baixa fertilidade de vacas acíclicas (BISINOTTO et al., 2015b).

Além de afetar a pulsatilidade de LH, a concentração de P4 durante desenvolvimento folicular altera também a proporção de duplas ovulações, na verdade aumentando este acontecimento (CERRI et al., 2011a), pois há aumento da porcentagem de vacas com presença de co-dominâcia folicular (HAYASHI et al., 2008). DENICOL et al., 2012 mostraram realmente que quando a concentração de P4 é menor há maior ocorrência de duplas ovulações, ao demonstrar que vacas no

início do diestro (quando a P4 ainda é baixa, e começa a aumentar gradualmente) quando suplementadas com P4 apresentam taxas semelhantes de ovulação dupla comparadas à vacas em diestro mais avançado (quando a P4 já é maior), porém menores taxas comparadas à vacas no início do diestro sem nenhuma suplementação. A produção de leite pode também estar associada ao aumento de duplas ovulações, pois quanto maior a produção menor a concentração de P4 devido ao aumento da IMS (IMS leva ao aumento da metabolização hepática de P4). De fato esta relação foi demonstrada por LOPEZ et al., 2005, visto que por volta de 50% das vacas com produção leiteira maior que 50 kg/dia tiveram dupla ovulação, enquanto que menos de 10% das vacas produzindo abaixo de 40 kg/dia apresentaram dupla ovulação. A estação do ano também interfere, sendo que nas épocas quentes do ano ocorrem maiores taxas de dupla ovulação que nas épocas mais frias (PEREIRA et al., 2015).

Baixa P4 além de afetar mecanismos fisiológicos no ciclo em que ocorre [como por exemplo interferir na dinâmica folicular (CERRI et.al., 2011a; CERRI et.al., 2011b; SARTORI et al., 2004)], afeta também alguns parâmetros no ciclo estral subsequente, isto porque vacas com baixas concentrações de P4 em um ciclo apresentam maiores taxas de luteólise prematura no próximo ciclo estral (GARVERICK et al., 1992; ZOLLERS et al., 1993; CERRI et al., 2011b; Silvia et al., 1991; Lima et al., 2009; INSKEEP, 2004) em decorrência da liberação prematura de PGF2α pelo endométrio (GARVERICK et al., 1992; ZOLLERS et al, 1993). A liberação precoce de PGF2α é consequência de baixa P4 durante desenvolvimento folicular, o que leva a alteração na expressão de receptores-α de E2 no endométrio (CERRI et al., 2011b), aumenta a expressão de receptores de ocitocina (INSKEEP, 2004) e a resposta endometrial à ocitocina (SHAHAM-ALBALANCY et al., 2001; CERRI et.al., 2011b), todos fatores levando a ciclos estrais de curta duração. Um dos indicativos de que realmente este fenômeno é decorrente de baixas concentrações de P4 é o aumento de PGFM após o desafio com ocitocina no ciclo subsequente ao ciclo influenciado por baixa P4, fato demonstrado por MANN & LAMMING, 1995. Ainda, CERRI et al., 2009 observaram que o tratamento com CIDR durante a préssincronização em vacas anovulares diminui a taxa de re-inseminação dentro de 6 a 17 dias pós IATF, o que realmente sugere uma

diminuição na incidência de luteólise prematura e fases luteais curtas em vacas suplementadas com P4 exógena. Em ovelhas também ficou provado a influência da P4 nas mudanças de expressão de receptores endometriais, já que a adição de P4 diminui o desenvolvimento de receptores de ocitocina (LAU et al., 1992). Vacas com baixo DEL também podem apresentar maiores taxas de ciclos curtos, assim como novilhas, devido a não pré exposição endometrial a níveis satisfatórios de P4. A falta de uma prévia fase luteal (fato que ocorre em vacas pós parto, ou seja, baixo DEL, e novilhas pré púberes) realmente induz secreção prematura de PGF2α e prematura luteólise, levando a um ciclo estral curto (GARVERICK et al., 1992). A suplementação com P4 pode ser estratégia para combater este problema, já que reduz a proporção de vacas que apresentam ciclos estrais curtos pós IA (BISINOTTO et al., 2013). Além da inadequada P4, baixas concentrações de E2 também podem influenciar no ambiente uterino, visto que vacas detectadas em cio (portanto provavelmente com maiores concentrações de E2) são menos propensas a serem re-inseminadas entre 5 e 17 dias pós IA em comparação a animais que não apresentam estro (BISINOTTO et al., 2015b). Portanto, além de P4, E2 durante estro pode interferir na morfologia uterina, influenciando na liberação precoce de PGF2α pelo endométrio.

As concentrações de P4 não são apenas importantes durante o desenvolvimento folicular, como também pós IA, além de serem prejudiciais nos momentos acerca da ovulação. Concentrações de P4 devem ser baixas no dia da IA, especialmente em protocolos cujo estímulo ovulatório é o ECP. Baixas concentrações também são necessárias quando o estímulo ovulatório é o GnRH, e até em protocolos de TETF. PEREIRA et al., 2013b mostraram que valores de P4 acima de 0,1 ng/ml já chegam a diminuir a fertilidade na IATF, enquanto que 0,22 ng/ml é o patamar para TETF. Outros autores referiram concentrações um pouco maiores na IATF à base de GnRH, variando de 0,24 ng/ml a 0,5 ng/ml (SANTOS et al., 2010b; BRUSVEEN et al., 2009; GIORDANO et al., 2012b; MARTINS et al., 2011a, 2011b). Os efeitos negativos de maior P4 ao redor da ovulação parecem ser mediados através de transporte de gametas, fertilização, ou desenvolvimento inicial do embrião (PEREIRA et al., 2013b).

A concentração de P4 pós IA interfere na P/IA de vacas em lactação (HERLIHY et al., 2012; PEREIRA et al., 2014; LIMA et al., 2009; LAMMING et al., 1989). O aumento de P4 pós IA comumente é relacionado com maior fertilidade (HERLIHY et al., 2012; PEREIRA et al., 2014; LIMA et al., 2009), pois são relacionados com aumento na elongação do concepto (GARRETT et al., 1988; SATTERFIELD et al., 2006; CARTER et al., 2008), aumento na produção de interferon-tau (MANN & LAMMING, 2001), e maiores taxas de prenhez em bovinos (STRONGE et al., 2005; McNEILL et al., 2006). Ainda, baixas concentrações de P4 são relacionadas com menor fertilidade (LAMMING et al., 1989), visto que poucas vacas com P4 abaixo de 2,00 ng/mL 11 dias pós IA emprenham (5.8%) (HERLIHY et al., 2012). Algumas estratégias podem ser utilizadas para aumentar a P4 visando maior desenvolvimento embrionário e maiores taxas de manutenção da gestação, como suplementação exógena de P4, ou aplicação de hormônios que visam ovulação e formação de um CL acessório. O uso de eCG tem sido relatado com resultados satisfatórios em melhorar as taxas de prenhez pós IA ou TE, porém esses resultados não são tão satisfatórios em vacas leiteiras em lactação em comparação a novilhas ou vacas de corte (BO *et al.*, 2011). O diâmetro do folículo ovulatório um ciclo estral antes pode também ser um fator que interfira na concentração de P4 pós IA, já que folículos de maior diâmetro vão gerar CLs de maior tamanho também, o que pode refletir em maior produção endógena de P4. Alguns relatos realmente confirmam isto, haja visto que a ovulação de folículos maiores foi correlacionado positivamente com a concentração de P4 durante o diestro do ciclo estral subsequente (PEREIRA et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2001; MUSSARD et al., 2007; CERRI et al., 2009). Porém outros trabalhos não observaram esta relação positiva, já que não apresentaram diferença na concentração de P4 pós ovulação, mesmo com diferenças no diâmetro folicular e formação de CLs de maior diâmetro (CERRI et al., 2011a, 2011b). A expressão de estro pode também alterar a produção endógena de P4, aumentando a concentração circulante de P4 (PEREIRA et al., 2014) resultando em acréscimo na fertilidade.

Visto o grande impacto que a P4 apresenta na fertilidade de bovinos em lactação, e também o que acarreta a deficiência de concentrações de P4 tanto durante

o desenvolvimento folicular quanto no diestro subsequente à IA, já que a P4 nos distinstos instantes é com frequência relacionada positivamente com a fertilidade (INSKEEP & DAILEY, 2005), medidas que visem a aumentar a P4 nos dois momentos podem refletir em aumento da fertilidade. Por exemplo, sabe-se que vacas expostas a concentrações maiores que 2 ng/ml durante desenvolvimento folicular apresentam maior P/IA (P4< 2ng/ml= 29,4%; P4≥ 2ng/ml= 55,3%) (BISINOTTO et al., 2015b). Portanto protocolos de sincronização de estro para vacas leiteiras em lactação devem permitir o crescimento do folículo sob ação de concentração de P4 maior que 2 ng/ml para maximizar a P/IA (DENICOL et.al., 2012), talvez devido ao fato de que a partir desse patamar de P4 a porcentagem de vacas que produzem pelo menos 1 embrião de boa qualidade é maior (RIVERA et al., 2011). Ainda, quanto maior a P4 no momento da aplicação de PGF2α maior a fertilidade dos animais (BISINOTTO et al., 2010b; PEREIRA et al., 2013a, 2014; DISKIN et al., 2006). A suplementação exógena de P4 durante protocolos de IATF portanto é uma medida interessante para se aumentar a fertilidade, já que aumenta a P4 antes da IA, e pode impactar positivamente na concentração de P4 pós IA (Melendez et al., 2006; Chebel et al., 2008). Contudo a resposta é variada, pois diversos estudos já relataram a suplementação de P4 durante protocolo de IATF, com resultados distintos, alguns relatando melhora na fertilidade (SANCHES, 2013; EL-ZARKOUNY et al., 2004a; MELENDEZ et al., 2006; STEVENSON et al., 2006; BISINOTTO et al., 2013, 2015b), e alguns não apresentando efeito algum (EL-ZARKOUNY et al., 2004b; GALVAO et al., 2004; BISINOTTO et al., 2015c).

Além de ter influência direta na fertilidade de vacas leiteiras em lactação, a concentração de P4 pode indiretamente atuar também, pois diferentes concentrações de P4 durante desenvolvimento folicular podem alterar a concentração de E2 durante o proestro (CERRI et al., 2011a), além de alterar a expressão endometrial de receptores-α de E2 (CERRI et al., 2011b), assim limitando tanto a quantidade como a funcionalidade de E2. Sabe-se que E2 é vital para fertilidade, haja visto o impacto que a duração do proestro e expressão de estro apresentam, pois o aumento na duração do proestro talvez aumente as concentrações de E2 próximo a IA (BRIDGES et al., 2010). Reduzindo o proestro de 2,25 dias para 1,25 dias ocorre maior taxa de luteólise prematura no ciclo subsequente [35% (40) vs. 82% (38)] e há

redução da fertilidade (BRIDGES et al., 2010). Em vacas *Bos indicus* a duração do proestro já se mostrou importante, tanto em animais solteiros como em vacas paridas. Em vacas Nelore paridas e com presença de CL no meio do protocolo de sincronização de cio, o tratamento com PGF2α antecipado em dois dias (dois dias antes da retirada do CIDR) aumenta a fertilidade [50.3% (171) vs. 36.1% (155)], embora nenhuma melhora seja notada em animais sem CL (MENEGHETTI et al., 2009). Da mesma maneira em vacas Nelore solteiras, o tratamento com PGF2α antecipado em dois dias também aumentou a P/IA nas vacas efetivamente sincronizadas (60.9 vs. 47.2%; PERES et al., 2009). Portanto em vacas de corte, ao se aumentar o período de duração entre a aplicação de PGF2α e a IA aumenta a fertilidade. Da mesma forma se observa em vacas Holandesas, ao se aumentar em 24 horas o período entre aplicação de PGF2α e a IA (48 para 72 horas) há um evidente aumento da fertilidade tanto em animais submetidos à IATF quanto em vacas submetidas a TETF (PEREIRA et al., 2013b). Paralelamente, a redução do proestro em protocolo à base de GnRH (Ovsynch) reduz a P/IA (PETERS & PURSLEY, 2003), enquanto que o aumento do proestro no Cosynch aumenta a fertilidade (RIBEIRO et al., 2012).

## 2.2 Diferenças na fertilidade entre primíparas e multíparas

Com relação a categoria animal, vários estudos reportam que primíparas geralmente apresentam maior fertilidade comparadas a multíparas quando submetidas à IATF (BRUSVEEN et al., 2008; SOUZA et al., 2008; GIORDANO et al., 2012b; HERLIHY et al., 2012, BISINOTTO et al., 2015c; MOREIRA et al., 2001; GUMEN et al., 2003; SILVA et al., 2007), mas essas diferenças na fertilidade ainda não foram adequadamente elucidadas. Além de maior P/IA, primíparas ainda apresentam menores taxas de perdas gestacionais (HERLIHY et al., 2012).

Um dos motivos pelos quais primíparas têm melhor fertilidade em relação a multíparas pode ser pelo fato de apresentarem maior concentração de P4 11 dias pós IA (4,41 ng/ml vs. 3,31 ng/ml), como demonstrou HERLIHY et al., 2012. Outro importante fator é o tamanho uterino (volume total, diâmetro e comprimento). No geral, vacas prenhes apresentam menor tamanho uterino que vacas não prenhes,

assim como primíparas em relação as multíparas (primíparas têm menor tamanho uterino em todos quesitos em relação as multíparas). Essas mudanças no tamanho uterino pode ser um dos fatores que causam reduzida fertilidade em vacas de leite, principalmente em multíparas (BAEZ et al., 2014).

Outros parâmetros, como taxa de luteólise e incidência de duplas ovulações, são influenciados pela paridade. A taxa de luteólise já se mostrou maior em primíparas que em multíparas (MARTINS et al., 2011a; GIORDANO et al., 2012b). Esta diferença também pode explicar a diferença na fertilidade em relação a categoria animal, visto que regressão luteal incompleta resulta em elevadas concentrações de P4, como P4> 0,5 ng/ml (SOUZA et al., 2007) ou P4> 0,40 ng/mL (BRUSVEEN et al., 2009), o que reduz a P/IA em mais de 50% em animais submetidos à IATF. Já a maior taxa de duplas ovulações em multíparas (FRICKE & WILTBANK, 1999; HERLIHY et al., 2012) pode ser decorrente da maior produção leiteira desta categoria, já que as duplas ovulações são observadas com o aumento na produção (FRICKE & WILTBANK, 1999; LOPEZ et al., 2005a).

Apesar de apresentarem maior fertilidade, estudos relatam que geralmente há maior prevalência de aciclicidade em primíparas no pós parto comparadas à multíparas (MOREIRA et al., 2001; GUMEN et al., 2003; SILVA et al., 2007).

### 2.3.Distintos protocolos de IATF

A eficiência reprodutiva em vacas de leite de alta produção não é a ideal, incentivando o desenvolvimento de diversas estratégias de manejo reprodutivo com foco no aumento do uso da IA e melhoria nas taxas de prenhez em rebanhos leiteiros (THATCHER et al., 2006). Em muitos países, o E2 e a P4 são utilizados em programas de sincronização da ovulação e IATF (LUCY et al., 2004, VASCONCELOS et al., 2011a). Protocolos a base de GnRH e PGF2α também são usados em larga escala, como o Ovsynch, que efetivamente controla a 1ª e as subsequentes inseminações em vacas leiteiras em lactação (PURSLEY et al., 1995).

Um dos motivos pelos quais protocolos à base de E2 e P4 são mais usados no Brasil que protocolos à base de GnRH pode ser explicada pelo uso do ECP como estímulo ovulatório. Com a ovulação sendo induzida por ECP há aumento da expressão de estro (PEREIRA et al., 2013a), que por sua vez afeta positivamente a

P/IA (PEREIRA et al., 2013a; CERRI et al., 2004; GALVAO et al., 2004; BISINOTTO et al., 2013, 2015b, 2015c) e diminui as perdas gestacionais (PEREIRA et al., 2014; BISINOTTO et al., 2013). Em geral, vacas que apresentam sinais de estro em resposta ao protocolo de IATF têm melhor fertilidade (SANTOS et al.,2010).

Por outro lado, animais que recebem GnRH no início da sincronização de estro (submetidos ao protocolo 5-d Cosynch) apresentam maior concentração de P4 circulante no dia da aplicação da PGF2α em comparação a animais que não recebem a aplicação do hormônio (neste caso, animais sincronizados através de protocolo à base de E2/P4) (2.66 ± 0.13 vs. 1.66 ± 0.13 ng/mL, respectivamente) (PEREIRA et al., 2013a), o que é relacionado com maior fertilidade. Isto se deve ao fato de que o GnRH induz ovulação no início do protocolo, enquanto que a combinação do E2 com a P4 induz a atresia do folículo dominante e o recrutamento de uma nova onda folicular no início do protocolo. Ainda, Pereira et al., 2013a demonstraram que os animais, quando apresentam CL no dia da administração de PGF2α, apresentam maior fertilidade, independentemente do tipo de protocolo utilizado (5-d Cosynch [sem CL = 12.4% vs. com CL = 18.2%]; E2/P4 [sem CL = 16.7% vs. com CL = 24.1%]).

Portanto ambos protocolos (à base de GnRH/PGF2α; e à base de E2/P4) apresentam aspectos importantes que levam a maior fertilidade. O protocolo 5-d Cosynch apresenta maior concentração de P4 no momento da aplicação da PGF2α, enquanto que protocolos a base de E2 e P4 induzem maior expressão de estro nos animais (PEREIRA et al., 2013a).

Protocolos a base de E2 e P4 podem ser mesclados com protocolos a base de GnRH, a fim de se aproveitar os benefícios distintos que ambos trazem a fertilidade [GnRH: maior concentração de P4 no momento de aplicação da PGF2α; E2/P4: maior taxa de expressão de estro (PEREIRA et al, 2013a)]. PEREIRA et al., 2015 demonstrou, de fato, ao adicionar uma aplicação de GnRH no início de um protocolo à base de E2 e P4, que há aumento no número de animais com presença de CL (sem GnRH =56,9% vs. com GnRH =70,5%) e aumento na concentração de P4 (sem GnRH = 3,28 ± 0,22 ng/ml vs. com GnRH = 3,70 ± 0,21 ng/ml) no momento da aplicação de PGF2α, o que por fim refletiu na fertilidade dos animais nos dias 32

(sem GnRH =30,0% vs. com GnRH= 37,3%) e 60 (sem GnRH= 25,1% vs. com GnRH= 31,0%).

## 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BAEZ G.M., R.V. BARLETTA, B.O. CARDOSO, E. TREVISOL, M.C. WILTBANK. **Uterine size matters for fertility in lactating dairy cows.** *Animal Reproduction*. v. 11, n.3, p. 359. Jul./Sept. 2014.

BISINOTTO R.S., E.S. RIBEIRO, F.S. LIMA, N. MARTINEZ, L.F. GRECO, L.F. BARBOSA, P.P. BUENO, L.F. SCAGION, W.W. THATCHER, J.E.P. SANTOS. **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*. 96: 2214–2225. 2013.

BISINOTTO R.S., E.S. RIBEIRO, L.T. MARTINS, R.S. MARSOLA, L.F. GRECO, M.G. FAVORETO, C.A. RISCO, W.W. THATCHER, J.E.P. SANTOS. **Effect of interval between induction of ovulation and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for resynchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program.** *Journal of Dairy Science*. 93: 5798–5808. 2010b.

BISINOTTO R.S., R.C. CHEBEL, J.E.P. SANTOS. **Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 93: 3578–3587. 2010a.

BISINOTTO R.S., L.O. CASTRO , M.B. PANSANI , C.D. NARCISO , N. MARTINEZ , L.D.P. SINEDINO , T.L.C. PINTO , N.S. VAN DE BURGWAL , H.M. BOSMAN , R.S. SURJUS , W.W. THATCHER , J.E.P. SANTOS. **Progesterone supplementation to lactating dairy cows without a corpus luteum at initiation of the Ovsynch protocol.** *Journal of Dairy Science*. 98: 2515–2528. 2015b.

BO G.A., L.C. PERES, L.E. CUTAIA, D. PINCINATO, P.S. BARUSELLI, R.J. MAPLETOFT. **Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates.** *Reprod Fertil Dev*. 24: 272-277. 2011.

BRIDGES G.A., M.L. MUSSARD, C.R. BURKE, M.L. DAY. **Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle**. *Animal Reproduction Science*. 117: 208–215. 2010.

BRUSVEEN D.J., A.H. SOUZA, M.C. WILTBANK. **Effects of additional prostaglandin F2α and estradiol-17β during Ovsynch in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 92:1412–1422. 2009.

BRUSVEEN D.J., A.P. CUNHA, C.D. SILVA, P.M. CUNHA, R.A. STERRY, E.P. SILVA, J.N. GUENTHER, M.C. WILTBANK. **Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and artificial insemination (AI) during Ovsynch affects pregnancies per AI in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 91: 1044–1052. 2008.

CARTER F., N. FORDE, P. DUFFY, M. WADE, T. FAIR, M.A. CROWE, A.C. EVANS, D.A. KENNY, J.F. ROCHE, P. LONERGAN. **Effect of increasing progesterone concentration from day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers.** *Reprod Fertil Dev*. 20: 368-375. 2008.

CERRI, R.L.A., H.M. RUTIGLIANO, R.C. CHEBEL, J.E.P. SANTOS. **Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows.** *Reproduction.* 137: 813–823. 2009.

CERRI R.L.A., R.C. CHEBEL, F. RIVERA, C.D. NARCISO, R.A. OLIVEIRA, J.E.P. SANTOS. **Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: I. ovarian and embryonic responses.** *Journal of Dairy Science*. 94: 3342–3351. 2011a.

CERRI R.L.A., R.C. CHEBEL, F. RIVERA, C.D. NARCISO, R.A. OLIVEIRA, M. AMSTALDEN, G.M. BAEZ-SANDOVAL, L.J. OLIVEIRA, W.W. THATCHER, J.E.P. SANTOS. **Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses.** *Journal of Dairy Science.* 94: 3352–3365. 2011b.

CERRI R.L.A., J.E.P. SANTOS, S.O. JUCHEM, K.N. GALVAO, R.C. CHEBEL. **Timed artificial insemination with estradiol cypionate or insemination at estrus in high-producing dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 87: 3704–3715. 2004.

DEMETRIO D.G., R.M. SANTOS, C.G. DEMETRIO, J.L.M. VASCONCELOS. **Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows.** *Journal of Dairy Science.* 90: 5073–5082. 2007.

DENICOL A.C., G. LOPES Jr., L.G. MENDONCA, F.A. RIVERA, F. GUAGNINI, R.V. PEREZ, J.R. LIMA, R.G. BRUNO, J.E.P. SANTOS, R.C. CHEBEL. **Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 95: 1794–1806. 2012.

DISKIN M.G., J.J. MURPHY, J.M. SREENAN. **Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions.** *Animal Reproduction Science.* 96: 297–311. 2006.

EL-ZARKOUNY S.Z., J.A. CARTMILL, B.A. HENSLEY, J.S. STEVENSON. **Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone.** Journal of Dairy Science. 87: 1024–37. 2004a.

EL-ZARKOUNY, S.Z., J.S. STEVENSON. **Resynchronizing estrus with progesterone or progesterone plus estrogen in cows of unknown pregnancy status.** *Journal of Dairy Science*. 87: 3306–3321. 2004b.

FIKE K.E., F.N. KOJIMA, B.R. LINDSEY, E.G. BERGFELD, J.A. QUINTAL-FRANCO, E.J. MELVIN. **Regulation of frequency of luteinizing hormone pulses by magnitude of acute change in circulating concentration of progesterone of female cattle.** *Animal Reproduction Science.* 84: 279–91. 2004.

FRICKE P.M., M.C. WILTBANK. **Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows.** *Theriogenology.* 52: 1133–1143. 1999.

GALVAO K.N., J.E.P. SANTOS, S.O. JUCHEM, R.L.A. CERRI, A.C. COSCIONI, M. VILLASENOR. **Effect of addition of a progesterone intravaginal**

**insert to a timed insemination protocol using estradiol cypionate on ovulation rate, pregnancy rate, and late embryonic loss in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 87: 3508– 3517. 2004.

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

GARVERICK H.A., W.G. ZOLLERS, M.F. SMITH. **Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function.** *Animal Reproduction Science.* 28: 111–124. 1992.

GIORDANO J.O., M.C. WILTBANK, J.N. GUENTHER, R. PAWLISCH, S. BAS, A.P. CUNHA, P.M. FRICKE. **Increased fertility in lactating dairy cows resynchronized with Double-Ovsynch compared with Ovsynch initiated 32 d after timed artificial insemination.** *Journal of Dairy Science.* 95: 639–653. 2012b.

GUMEN A., J.N. GUENTHER, M.C. WILTBANK. **Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 86: 3184–3194. 2003.

HAYASHI K.G., M. MATSUI, T. SHIMIZU, N. SUDO, A. SATO, K. SHIRASUNA, M. TETSUKA, K. KIDA, D. SCHAMS, A. MIYAMOTO. **The absence of corpus luteum formation alters the endocrine profile and affects follicular development during the first follicular wave in cattle.** *Reproduction.* 136: 787–797. 2008.

HERLIHY M.M., J.O. GIORDANO, A.H. SOUZA, H. AYRES, R.M. FERREIRA, A. KESKIN, A.B. NASCIMENTO, J.N. GUENTHER, J.M. GASKA, S.J. KACUBA, M.A. CROWE, S.T. BUTLER, M.C. WILTBANK. **Presynchronization with Double-Ovsynch improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 95 :7003–7014. 2012.

INSKEEP E.K., R.A. DAILEY. Embryonic death in cattle. vet. clin. north am. food anim. pract. 21: 437–461. 2005.

INSKEEP, E.K. **Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow.** *Journal of Animal Science.* 82(E. Suppl.):E24–E39. 2004.

Lamming G.E., A.O. Darwash, G.E. Mann. **Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality.** *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 37: 245–252. 1989.

LAU T.M., G.B. GOW, R.J FAIRCLOUGH. **Differential effects of progesterone treatment on the oxytocin-induced prostaglandin F2a response and the levels of endometrial oxytocin receptors in ovariectomised ewes.** *Biology of Reproduction.* 46**:** 17–22. 1992.

LIMA F.S., R.S. BISINOTTO, E.S. RIBEIRO, H. AYRES, L.F. GRECO, K.N. GALVAO, C.A. RISCO, W.W. THATCHER, J.E.P. SANTOS. **Effect of one or three timed artificial inseminations before natural service on reproductive performance of lactating dairy cows not observed for detection of estrus.** *Theriogenology.* 77: 1918–1927. 2012.

LIMA J.R., F.A. RIVERA, C.D. NARCISO, R. OLIVEIRA, R.C. CHEBEL, J.E.P. SANTOS. **Effect of increasing amounts of supplemental P4 in a timed artificial insemination protocol on fertility of lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 92: 5436–5446. 2009.

LONERGAN P. **Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows.** *Theriogenology*. 76: 1594–1601. 2011.

LOPEZ H., D.Z. CARAVIELLO, L.D. SATTER, P.M. FRICKE, M.C. WILTBANK. **Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 88: 2783–2793. 2005a.

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

MANN G.E., G.E. LAMMING. **Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows.** *Reproduction*. 121: 175-180. 2001.

MANN G.E., G.E. LAMMING. **Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows.** *Journal of Reproduction and Fertility*. 104: 1–5. 1995.

MARTINS J.P.N., R.K. POLICELLI, J.R. PURSLEY. **Luteolytic effects of cloprostenol sodium in lactating dairy cows treated with G6G/Ovsynch.** *Journal of Dairy Science.* 94: 2806–2814. 2011b.

MARTINS J.P.N., R.K. POLICELLI, L.M. NEUDER, W. RAPHAEL, J.R. PURSLEY. **Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F2α of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 94: 2815–2824. 2011a.

McNEILL R.E., M.G. DISKIN, J.M. SREENAN, D.G. MORRIS. **Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows**. *Theriogenology*. 65: 1435-1441. 2006.

MELENDEZ P., G. GONZALEZ, E. AGUILAR, O. LOERA, C. RISCO, L.F. ARCHBALD. **Comparison of two estrus-synchronization protocols and timed artificial insemination in dairy cattle.** *Journal of Dairy Science*. 89: 4567–4572. 2006.

MENEGHETTI M., O.G. SA FILHO, R.F.G. PERES, G.C. LAMB, J.L.M. VASCONCELOS. **Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols.** *Theriogenology.* 72: 179–189. 2009.

MIHM M., A. BAGUISI, M.P. BOLAND, J.F. ROCHE. **Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers.** *Journal of Reproduction and Fertility.* 102: 123–130. 1994.

MOREIRA F., C. ORLANDI, C.A. RISCO, R. MATTOS, F. LOPES, W.W. THATCHER. **Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 84: 1646–1659. 2001.

MUSSARD M.L., C.R. BURKE, E.J. BEHLKE, C.L. GASSER, M.L. DAY. **Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle.** *Journal of Animal Science*. 85: 937–943. 2007.

PEREIRA M.H.C.; C.P. SANCHES, T.G. GUIDA, A.D.P. RODRIGUES, F.L. ARAGON, M.B. VERAS, P.T. BORGES, M.C. WILTBANK, J.L.M.

VASCONCELOS. **Timing of prostaglandin F2α treatment in an estrogen-based protocol for timed artificial insemination or timed embryo transfer in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 96: 2837-46. 2013b.

PEREIRA M.H.C., A.D.P. RODRIGUES, R.J. DE CARVALHO, M.C. WILTBANK, J.L.M. VASCONCELOS. **Increasing length of an estradiol and progesterone timed artificial insemination protocol decreases pregnancy losses in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 97: 1454–1464. 2014.

PEREIRA M.H.C., A.D.P. RODRIGUES, T. MARTINS, W.V.C. OLIVEIRA, P.S. SILVEIRA, M.C. WILTBANK, J.L.M. VASCONCELOS. **Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: Comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol.** *Journal of Dairy Science.* 96: 6904–6914. 2013a.

PEREIRA M.H.C., M.C. WILTBANK, L.F.S.P. BARBOSA, W.M. COSTA Jr., M.A.P. CARVALHO, J.L.M. VASCONCELOS. **Effect of adding a gonadotropin-releasing-hormone treatment at the beginning and a second prostaglandin F2α treatment at the end of an estradiol-based protocol for timed artificial insemination in lactating dairy cows during cool or hot seasons of the year.** *Journal of Dairy Science.* 98: 947–959. 2015.

PERES R.F.G., I. CLARO JUNIOR, O.G. SA FILHO, G.P. NOGUEIRA, J. L.M. VASCONCELOS. **Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination.** *Theriogenology.* 72: 681–689. 2009.

PETERS M.W., J.R. PURSLEY. **Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows.** *Theriogenology.* 60: 1197– 1204. 2003.

PURSLEY, J.R., M.R. KOSOROK, M.C. WILTBANK. **Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation.** *Journal of Dairy Science*. 80:301–306. 1997a.

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

RIBEIRO E.S., A.P.A. MONTEIRO, F.S. LIMA, H. AYRES, R.S. BISINOTTO, M. FAVORETO, L.F. GRECO, R.S. MARSOLA, W.W. THATCHER, J.E.P. SANTOS. **Effects of presynchronization and length of proestrus on fertility of grazing dairy cows subjected to a 5-day timed artificial insemination protocol.** *Journal of Dairy Science*. 95: 2513–2522. 2012.

RIVERA F.A., L.G. MENDONCA, G. LOPES Jr., J.E. SANTOS, R.V. PEREZ, M. AMSTALDEN, A. CORREA-CALDERON, R.C. CHEBEL. **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.* 141: 333–342. 2011.

ROBERSON M.S., M.W. WOLFE, T.T. STUMPF, R.J. KITTOK, J.E. KINDER. **Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of P4.** *Biology of Reproduction.* 41: 997–1003. 1989.

SANGSRITAVONG S., D.K. COMBS, R. SARTORI, M.C. WILTBANK. **High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17β in dairy cattle.** *Journal of Dairy Science*. 85: 2831–2842. 2002.

SANTOS, J.E.P., H.M. RUTIGLIANO, M.F. SA FILHO. **RISK FACTORS FOR RESUMPTION OF POSTPARTUM CYCLICITY AND EMBRYONIC SURVIVAL IN LACTATING DAIRY COWS.** *Animal Reproduction Science.* 110: 207– 221. 2009.

SANTOS, J.E.P., W.W. THATCHER, R.C. CHEBEL, R.L.A. CERRI, K.N. GALVAO. **THE EFFECT OF EMBRYONIC DEATH RATES IN CATTLE ON THE EFFICACY OF ESTRUS SYNCHRONIZATION PROGRAMS.** *Animal Reproduction Science.* 82–83: 513–535. 2004.

SANTOS J.E.P., C.D. NARCISO, F. RIVERA, W.W. THATCHER, R.C. CHEBEL. **Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed AI protocol on reproduction of dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 93: 2976–2988. 2010b.

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

SATTERFIELD M.C., F.W. BAZER, T.E. SPENCER. **Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus**. *Biology of Reproduction.* 75: 289-296. 2006.

SAVIO J.D., W.W. THATCHER, L. BADINGA, R.L. DE LA SOTA, D. WOLFENSON. **Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows.** *Journal of Reproduction and Fertility*. 97: 197–203. 1993.

SHAHAM-ALBALANCY A., Y. FOLMAL, M. KAIM, M. ROSENBERG, D. WOLFENSON. **Delayed effect of low progesterone concentration on bovine uterine PGF2a secretion in the subsequent oestrous cycle.** *Reproduction.* 122: 643–648. 2001.

SILVA E., R.A. STERRY, P.M. FRICKE. **Assessment of a practical method for identifying anovular dairy cows synchronized for first postpartum timed artificial insemination.** *Journal of Dairy Science.* 90: 3255–3262. 2007.

SILVIA W.J., G.S. LEWIS, J.A. MCCRACKEN, W.W. THATCHER, L. WILSON Jr. **Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2α during luteolysis in ruminants.** *Biology of Reproduction.* 45: 655–663. 1991.

SOUZA A.H., A. GUMEN, E.P. SILVA, A.P. CUNHA, J.N. GUENTHER, C.M. PETO, D.Z. CARAVIELLO, M.C. WILTBANK. **Supplementation with estradiol-17β before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 90: 4623–4634. 2007.

SOUZA A.H., H. AYRES, R.M. FERREIRA, M.C. WILTBANK. **A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows.** *Theriogenology.* 70: 208–215. 2008.

STEVENSON J.S., J.R. PURSLEY, H.A. GARVERICK, P.M. FRICKE, D.J. KESLER, J.S. OTTOBRE JS. **Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch.** *Journal of Dairy Science.* 89: 2567–78. 2006.

STRONGE A.J., J.M. SREENAN, M.G. DISKIN, J.F. MEE, D.A. KENNY, D.G. MORRIS. **Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows.** *Theriogenology*. 64: 1212-1224. 2005.

THATCHER W.W., T.R. BILBY, J.A. BARTOLOME, F. SILVESTRE, C.R. STAPLES, J.E.P. SANTOS. **Strategies for improving fertility in the modern dairy cow.** *Theriogenology.* 65: 30–44. 2006.

TENHAGEN B.A., M. DRILLICH, R. SURHOLT, W. HEUWIESER. **Comparison of timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: reproductive and economic considerations.** *Journal of Dairy Science.* 87: 85–94. 2004.

VASCONCELOS J.L.M., R. SARTORI, H.N. OLIVEIRA, J.G. GUENTHER, M.C. WILTBANK. **Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate.** *Theriogenology*. 56: 307–314. 2001.

VASCONCELOS J.L.M., S. SANGSRITAVONG, S.J. TSAI, M.C. WILTBANK. **Acute reduction in serum progesterone concentration after feed intake in dairy cows.** *Theriogenology.* 60: 795–807. 2003.

WILTBANK M.C., P.D. CARVALHO, A. KESKIN, K.S. HACKBART, M.A. MESCHIATTI, M.R. BASTOS, J.N. GUENTHER, A.B. NASCIMENTO, M.M. HERLIHY, M.C. AMUNDSON, A.H. SOUZA. **Effect of progesterone concentration during follicle development on subsequent ovulation, fertilization, and early embryo development in lactating dairy cows.** Abstract no. 685 in Proc. 44th Annu. Mtg. Soc. Study Reprod., Portland, Oregon. Society for the Study of Reproduction, Madison, WI. 2011a.

WILTBANK M.C., A.H. SOUZA, P.D. CARVALHO, A.P. CUNHA, J.O. GIORDANO, P.M. FRICKE, G.M. BAEZ, M.G. DISKIN. **Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle.** *Animal.* 8: 70–81. 2014.

WILTBANK M.C., H. LOPEZ, R. SARTORI, S. SANGSRITAVONG, A. GUMEN. **Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism.** *Theriogenology.* 65: 17– 29. 2006.

ZOLLERS W.G., H.A. GARVERICK, M.F. SMITH, R.J. MOFFATT, B.E. SALFEN, R.S. YOUNGQUIST. **Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrus cycle.** *Journal of Reproduction and Fertility.* 97: 329–337. 1993.

# CAPÍTULO 2

## Concentração de progesterona durante protocolo a base de P4/BE na prenhez à IATF em vacas Holandesas em lactação

**RESUMO**

O presente estudo avaliou se a concentração de P4 durante o desenvolvimento do folículo ovulatório em protocolo a base de P4/BE e com uma aplicação de GnRH em seu início interfere na prenhez à IATF em vacas Holandesas em lactação. A hipótese é que vacas com maior P4 no dia da aplicação da 1ª dose de PGF2α terão maior fertilidade. Para alterar a P4 os animais (n=594) foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos para receberem um ou dois dispositivos intravaginais de P4 (CIDR®, Zoetis, SP, Brasil). O protocolo utilizado foi: no d-11 inserção de 1 CIDR (novo ou previamente usado por 9 dias) + aplicação de 2mg i.m. de BE (Gonadiol®, Zoetis, SP, Brasil) + 100mcg i.m. de GnRH (Cystorelin®, Merial, SP, Brasil); d-4, aplicação de 25mg i.m. de Dinoprost (Lutalyse®, Zoetis, SP, Brasil); d-2, aplicação de 25mg i.m. de Dinoprost + 1mg i.m. de ECP (ECP®, Zoetis, SP, Brasil) + retirada do dispositivo de P4; d0, IATF. Os animais do grupo 2CIDR receberam um CIDR adicional no d-11, o qual foi retirado no d-4. Nos d-11 (n= 117), d-4 (n= 351), d0 (n= 214) e d10 (n= 72) foram colhidas amostras de sangue para determinação da concentração de P4. A P/IA foi determinada através de US nos d32 (DG1) e d60 (DG2). Dados binários foram analisados pelo PROC GLIMMIX, e os dados contínuos pelo PROC MIXED do SAS (foi considerada diferença significativa se P<0,05 e tendência se P<0,1). A P4 não diferiu entre os tratamentos no d-11 (1CIDR= 4,2±0,4 ng/ml; 2CIDR= 4,5± 0,4ng/ml; P>0,1), e no d-4 (1CIDR= 3,5±0,2ng/ml; 2CIDR= 3,8±0,2 ng/ml; P>0,1), porém foi detectada interação entre tratamento e presença de CL no início do protocolo na P4 no d-4 (sem presença de CL e 1CIDR= 2,7±0,3ng/ml; 2CIDR= 3,6±0,3ng/ml, com presença de CL e 1CIDR= 4,3±0,3ng/ml; 2CIDR= 4,0±0,3ng/ml; P<0,05). Não houve diferença na prenhez a IATF e nas perdas gestacionais entre os tratamentos [DG1: 1CIDR= 20,0% (81/310) vs. 2CIDR= 15,7% (65/284); DG2: 1CIDR= 18,2% (74/310) vs. 2CIDR= 13,8% (57/283); Perdas gestacionais: 1CIDR= 14,1% (7/81) vs. 2CIDR= 11,5% (7/64); P<0,05]. Foi detectada tendência para interação entre a concentração de P4 no d-4 e ordem no DG1 [P4<2.61ng/ml: Primíparas= 14,3% (16/69) vs. Multíparas= 10,7% (21/107); P4≥2.61ng/ml: Primíparas= 37,0% (28/63) vs. Multíparas= 14,6% (30/113); P= 0,06], e no DG2 [P4<2,61ng/ml: Primíparas=

12,4% (14/69) vs. Multíparas= 8,4% (19/107); P4≥2,61ng/ml: Primíparas= 34,2% (27/63) vs. Multíparas= 11,2% (27/113); P= 0,05], onde primíparas que apresentavam P4 maior que a mediana no d-4 obtiveram maior fertilidade, enquanto que em multíparas a concentração de P4 não interferiu na P/IA. Da mesma forma, ao se analisar a probabilidade de prenhez por concentração de P4 no d-4, observou-se que quanto maior a P4 no referido dia, maior a probabilidade de prenhez nas primíparas tanto no d32 (P=0,04) como no d60 (P=0,02), porém nas multíparas a P4 não influenciou a probabilidade de prenhez em ambos diagnósticos de gestação (d32: P= 0,34; d60: P=0,32). A suplementação de P4 exógena em animais submetidos a protocolo de IATF a base de P4/E2 com aplicação de GnRH em seu início não interferiu na prenhez a IATF. Aumento de P4 durante o desenvolvimento folicular aumenta a fertilidade em primíparas, mas não em multíparas.

**Palavras Chave: Progesterona; Fertilidade; Primíparas.**

## ABSTRACT

The present study evaluated if P4 concentration during ovulatory follicle development in a timed artificial insemination (TAI) protocol based on P4/E2 affects pregnancy per AI in lactating Holstein cows. Our hypothesis is that cows that present higher P4 concentration at PGF2α administration have also higher fertility. To alter P4, animals (n=594) were randomly assigned to receive one or two intravaginals devices of P4 (CIDR®, Zoetis, SP, Brazil). TAI protocol utilized was: d-11 intravaginal device of P4 (new or previously used by 9 days) + 2mg im EB (Gonadiol®, Zoetis, SP, Brazil) + 100mcg im GnRH (Cystorelin®, Merial, SP, Brazil); d-4, 25mg im Dinoprost (Lutalyse®, Zoetis, SP, Brazil); d-2, 25mg im Dinoprost + 1mg im ECP (ECP®, Zoetis, SP, Brazil) + CIDR removal; d0, TAI. Animals in the group 2CIDR received an adicional CIDR at d-11, which was removed at d-4. At d-11 (n=117), d-4 (n=351), d0 (n=214) and d10 (n=72), blood samples were taken from cows for P4 concentration measurements. Pregnancy per AI was determined by ultrasound at d32 (DG1) and d60 (DG2). The binomial data were analyzed using PROC GLIMMIX and continuous data using PROC MIXED of SAS. An effect was considered significant when P<0.05 and tendency when P<0.1. P4 did not differ among treatments at d-11 (1CIDR=4.2±0.4ng/ml; 2CIDR=4.5±0.4ng/ml; P>0.1), and at d-4 (1CIDR=3.5±0.2ng/ml; 2CIDR=3.8±0.2 ng/ml; P>0.1). An interaction was detected between treatment and CL presence at the beginning of TAI protocol in P4 at d-4 (without CL and 1CIDR=2.7±0.3ng/ml; 2CIDR= 3.6±0.3ng/ml, with CL and 1CIDR=4.3±0.3ng/ml; 2CIDR= 4.0±0.3ng/ml; P<0.05). There was no difference among treatments in pregnancy per AI and pregnancy loss between DG1 and DG2 [DG1: 1CIDR= 20,0% (81/310) vs. 2CIDR= 15,7% (65/284); DG2: 1CIDR= 18,2% (74/310) vs. 2CIDR= 13,8% (57/283); Pregnancy loss: 1CIDR= 14,1% (7/81) vs. 2CIDR= 11,5% (7/64); P>0,1]. 37,0% (28/63). A tendency of interaction was detected between P4 concentration at d-4 and parity (Primiparous=PP; Multiparous=MP) on DG1 [P4<2.61ng/ml: PP= 14,3% (16/69) vs MP=10,7% (21/107); P4≥2.61ng/ml: PP=37,0% (28/63) vs MP=14.6%[30/113]; P<0,1), and on DG2 [P4<2.61ng/ml: PP= 12.4% (14/69) vs.

MP= 8.4% (19/107); P4≥2.61ng/ml: PP= 34.2% (27/63) vs. MP= 11.2% (27/113); P= 0,05], in which primiparous cows that presented higher P4 concentration than median on d-4 had better fertility, whereas P4 did not influence P/AI on multiparous. Similarly, when analyzing the probability of pregnancy by P4 concentration in d-4, it was observed that the higher the P4 in that day, the greater the probability of pregnancy in primiparous cows at d32 (P = 0.04) as at d60 (P = 0.02), but in multiparous cows P4 concentration did not influence the probability of pregnancy in both pregnancy diagnostics (d32 P = 0.34; d60 P = 0.32). Exogenous supplementation of P4 in lactating Holstein cows submitted to a TAI protocol based on P4/E2 with an injection of GnRH at it beginning did not alter the pregnancy. The increase of P4 during follicular development increase the fertility in primiparous cows, but not in multiparous.

**Keywords: Progesterone; Fertility; Primiparous.**

# 1. Introdução

Vacas Holandesas especializadas apresentam reduzida fertilidade (LUCY, 2001; SANTOS et al., 2004), provavelmente devido a diversos fatores, e é comumente associada com a alta produção leiteira e com as baixas concentrações sanguíneas de P4 (WILTBANK et al., 2006). O decréscimo na circulação sanguínea de P4 em vacas leiteiras em lactação é associado com mudanças nos padrões de desenvolvimento das ondas foliculares (WILTBANK et al., 2006) e com a liberação endometrial de Prostaglandinas (SHAHAM-ALBALANCY et al., 2001), o que pode levar a um decréscimo na fertilidade. Esses animais, de fato, apresentam menores concentrações circulantes de P4 (ainda, apresentam menores concentrações de E2) em comparação a vacas secas e novilhas leiteiras (SARTORI et al., 2004; WILTBANK et al., 2006), o que pode estar associado ao aumento do fluxo sanguíneo no fígado, e consequentemente, maior metabolização hepática desses hormônios esteróides (VASCONCELOS et al., 2003; SANGSRITAVONG et al., 2002).

Baixas concentrações de P4 aumentam a frequência dos pulsos de LH e aumentam o período de dominância folicular, o que pode ser deletério se o folículo é mantido por longo período em tais circunstâncias (SAVIO et al., 1993). Na verdade, foi demonstrado que até mesmo pequenas variações na duração do período de dominância folicular afetam o desenvolvimento embrionário precoce (CERRI et al., 2009a) e a P/IA (BLEACH et al., 2004). De fato, um dos fatores que levam a menor fertilidade em animais que desenvolvem o folículo ovulatório sob baixas concentrações de P4, é que estas são inversamente proporcionais a frequência dos pulsos de LH e as concentrações de E2 (ROBERSON et al., 1989). Assim, vacas expostas a baixas concentrações de P4 têm maior diâmetro do folículo dominante (SARTORI et al., 2004) o que tem associação com oócitos que sofrem maturação nuclear precoce (REVAH & BUTLER, 1996) e com baixas taxas de prenhez (MIHM et al., 1994).

Por outro lado, a maior concentração de P4 durante o desenvolvimento folicular está associada a melhor fertilidade em vacas submetidas a protocolos Ovsynch (SOUZA et al., 2008), Ovsynch curto (SANTOS et al., 2010b) e protocolos à base de E2/P4 (PEREIRA et al., 2013a), o que pode estar associada a menor incidência de fases luteais curtas após a IA (SILVIA et al., 1991), e aumento na porcentagem de vacas que produzem embriões de boa e excelente qualidades (RIVERA et al., 2011). Portanto, altas concentrações de P4 durante o desenvolvimento do folículo ovulatório podem elevar a fertilidade dos animais submetidos à IATF, por diminuir a incidência de ciclos curtos subsequentes à IA, e por aumentar a qualidade embrionária.

Em muitos países, o E2 e a P4 são utilizados em programas de sincronização da ovulação e IATF (LUCY et al., 2004, VASCONCELOS et al., 2011a). Protocolos a base de GnRH e PGF2α também são usados em larga escala, como o Ovsynch, que efetivamente controla a 1ª e as subsequentes inseminações em vacas leiteiras em lactação (PURSLEY et al., 1995).

Animais que recebem GnRH ao início da sincronização de estro (submetidos ao protocolo 5-d Cosynch) apresentam maior concentração de progesterona circulante no dia da aplicação da PGF2α em comparação a animais que não recebem a aplicação do hormônio (neste caso, animais sincronizados através de protocolo à base de E2/P4) (2.66 ± 0.13 vs. 1.66 ± 0.13 ng/mL) (PEREIRA et al., 2013a). Isto se deve ao fato de que o GnRH induz ovulação no início do protocolo, enquanto que a combinação do E2 com a P4 induz a atresia do folículo dominante e o recrutamento de uma nova onda folicular no início do protocolo. Ainda, Pereira et al., 2013a demonstraram que os animais, quando apresentam CL no dia da administração intra muscular de PGF2α, apresentam maior fertilidade, independentemente do tipo de protocolo utilizado (5-d Cosynch [sem CL = 12.4% vs. com CL = 18.2%]; E2/P4 [sem CL = 16.7% vs. com CL = 24.1%]). Foi também demonstrado que animais submetidos a protocolos a base de E2 e P4 são mais propensos a apresentarem sinais de estro, em comparação a vacas submetidas ao 5-d Cosynch (62,8% vs. 43,4%), e que a expressão de estro resulta em maiores taxas de prenhez em ambos protocolos (PEREIRA et al., 2013a). Portanto ambos protocolos (à base de GnRH/PGF2α; e à base de E2/P4) apresentam aspectos importantes que levam a maior fertilidade. O

protocolo 5-d Cosynch apresenta maior concentração de P4 no momento da aplicação da PGF2α, enquanto que protocolos a base de E2 e P4 induzem maior expressão de estro nos animais (PEREIRA et al., 2013a).

Pereira et al., 2015 demonstrou, de fato, ao adicionar uma aplicação de GnRH no início de um protocolo à base de E2 e P4, que há aumento no número de animais com presença de CL (sem GnRH =56,9% vs. com GnRH =70,5%) e aumento na concentração de P4 (sem GnRH = 3,28 ± 0,22 vs. com GnRH = 3,70 ± 0,21 ng/ml) no momento da aplicação de PGF2α, o que por fim refletiu na fertilidade dos animais nos dias 32 (sem GnRH =30,0% vs. com GnRH= 37,3%) e 60 (sem GnRH= 25,1% vs. com GnRH= 31,0%), melhora notada apenas nas estações mais frias do ano.

Bisinotto et al., 2013 avaliaram a suplementação com 2 CIDRs em vacas sem CL no início do protocolo, e notaram que estes animais obtiveram taxa de prenhez similar à de vacas no diestro (43,7% vs. 47,3%), e maior em relação a vacas sem CL com apenas 1 CIDR (28,6%). Sanches, 2013 mostrou também maior taxa de prenhez aos 60 dias em vacas efetivamente sincronizadas que receberam um implante de P4 adicional, possivelmente devido a maior concentração de P4 no momento da aplicação de PGF2α. Nos dois estudos a suplementação com 2 CIDRs gerou melhora da fertilidade, mesmo em protocolos de sincronização de fisiologias distintas (protocolo 5-d Cosynch [à base de GnRH] e protocolo a base de E2/P4). A diferença do presente estudo é que os animais são submetidos a um protocolo que utiliza GnRH junto de BE no início, além de contar com animais que podem apresentar CL no ovário no início do protocolo.

O presente estudo teve por objetivo suplementar com P4 exógena os animais durante um protocolo de sincronização de estro a base de E2 e P4 com uma aplicação de GnRH em seu início, visando aumentar a concentração de P4 no momento da aplicação de PGF2α.

A hipótese é de que os animais com maior concentração de P4 durante o desenvolvimento do folículo ovulatório terão maior fertilidade.

# 2. Materiais e Métodos

## 2.1. Animais e instalações

Este experimento foi realizado na Fazenda Colorado, situada no município de Araras, no estado de São Paulo, compreendendo o período entre Fevereiro e Julho de 2014. Todos os procedimentos realizados com os animais seguiram as recomendações do *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching* (FASS, 1999). Durante o período experimental todas vacas ficaram alojadas em galpões *free-stall* fechados, que apresentavam a tecnologia de *cross ventilation*, com livre acesso a cochos de água. Os animais eram ordenhados três vezes ao dia, e todos os procedimentos relacionados ao estudo realizado, incluindo injeções, ultrassonografia ovariana, diagnóstico de gestação, colheita de sangue, e IATF, foram realizados enquanto as vacas se apresentavam contidas em canzis na linha de alimentação. As vacas eram alimentadas à vontade com uma dieta à base de silagem de milho formulada e balanceada para atender ou exceder as exigências nutricionais de vacas em lactação (NRC, 2001).

## 2.2. Delineamento Experimental

Dentro de cada um dos cinco lotes as vacas (todas em lactação, n=594) foram divididas aleatoriamente para receberem um de dois tratamentos: 1CIDR_ d-11 inserção de 1 dispositivo intravaginal impregnado por P4 (CIDR® 1,9 g de P4, Zoetis, SP, Brasil) novo ou previamente utilizado por 9 dias, aplicação de 2,0 mg IM de BE (2,0 mL de Gonadiol®, Zoetis, SP, Brasil), e aplicação de 100mcg IM de GnRH (Cystorelin®, Merial, SP, Brasil); sete dias após (d-4) aplicação de 25 mg IM de dinoprost trometamina (5,0 mL de Lutalyse®, Zoetis, SP, Brasil); dois dias depois (d-2), o dispositivo de P4 foi removido, as vacas receberam 1,0 mg IM de cipionato de estradiol (0,5 mL, ECP®, Zoetis, SP, Brasil) e 25 mg IM de dinoprost trometamina; e mais dois dias (d0) foi realizada a IATF. O tratamento 2CIDR

utilizou o mesmo protocolo do grupo 1CIDR, porém no d-11 foi inserido um dispositivo de P4 adicional, o qual foi retirado no d-4 (Figura 1).

Todas as vacas foram inseminadas na tarde programada para IATF por técnicos experientes (n = 3), utilizando-se sêmen comercial convencional de 10 touros diferentes.

A P/IA foi calculada dividindo-se o número de vacas gestantes nos dias 32 e 60 após a inseminação pelo número de vacas submetidas ao protocolo de IATF. A taxa de perda de gestação foi calculada dividindo-se o número de vacas que perderam a gestação entre os dias 32 e 60 pelo número de vacas gestantes no dia 32.

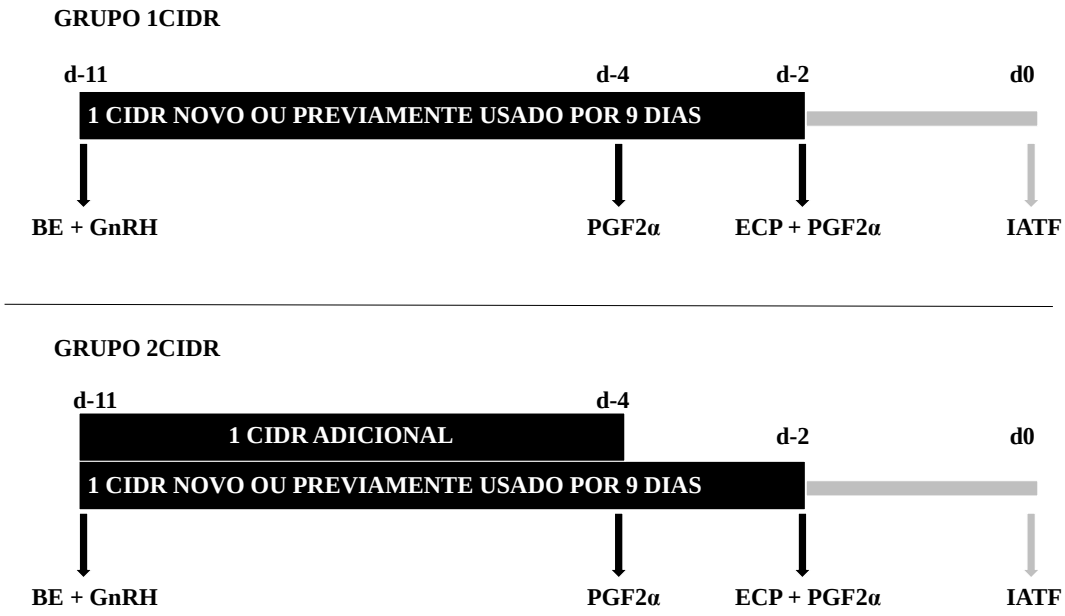


**Figura 1.** Esquema dos dois grupos experimentais

### 2.3. Ultrassonografia, Colheitas de sangue, Produção de leite, Detecção de cio

Os ovários foram examinados por ultrassonografia (US, Aloka SSD-500 com transdutor linear-array de 7,5 MHz, Aloka, Tokyo, Japan) imediatamente antes do início do protocolo de IATF (d-11) para determinação de presença de CL. Os diagnósticos de gestação foram realizados por ultrassonografia nos dias 32 e 60 após inseminação artificial.

As amostras de sangue foram colhidas da veia ou artéria coccígea, utilizando tubos a vácuo sem presença de anticoagulante nos d-11 (n= 117), d-4 (n= 351), d0 (n= 214) e d10 (n= 72) do experimento. Após a colheita, o tubo de sangue foi disposto na posição vertical e mantido em caixa térmica com gelo sintético até ser levado para o refrigerador a 4 °C. As amostras então foram centrifugadas a 1800 x g por 10 minutos à temperatura ambiente para separação do soro, o qual foi envasado em tubos *eppendorf* devidamente marcados para cada animal e armazenados a -20 °C até a realização das dosagens. A concentração sérica de progesterona foi quantificada com o kit de radioimunoensaio Coat-a-Count RIA kit (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) como descrito previamente (Kirby et al., 1997). Os coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaios para as análises de progesterona foram < 10%.

A produção de leite foi mensurada diariamente entre os d-11 e d0 do experimento e a produção média diária obtida neste intervalo foi utilizada na análise.

A detecção de cio era feita através do sistema pedômetro (CowScout™ Activity Monitoring System, GEA) (Figura 2). Os pedômetros marcavam a quantidade de passos por animal no período entre uma ordenha e outra. Quando a quantidade de passos era no mínimo dobrada entre um período de leitura e outro, o animal então era considerado em estro. A leitura dos pedômetros era feita a partir do momento em que era retirado o CIDR (d-2) até um dia pós IA.

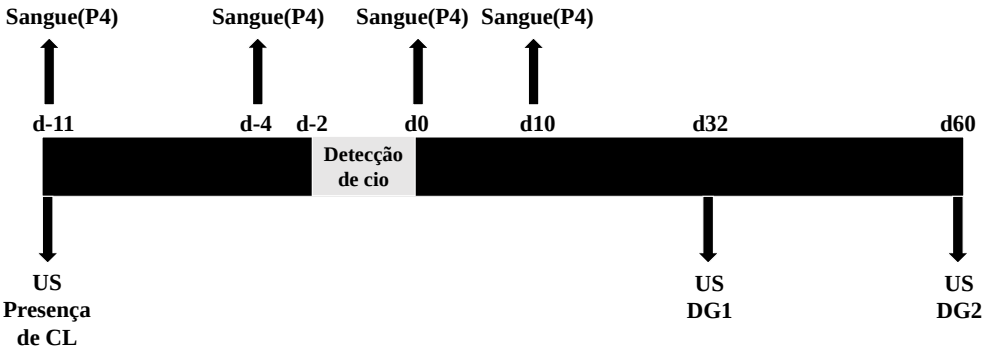


**Figura 2.** Esquematização de colheitas de sangue, utilização de US, e detecção de cio

### 2.4. Análise Estatística

As variáveis binomiais (expressão de cio, P/AI nos dias 32 e 60, e as perdas gestacionais entre os dias 32 e 60) foram analisadas utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS (SAS Institute Inc., Cary , NC, EUA), com vacas dentro de lotes como efeito aleatório, e as variáveis incluídas nos modelos foram tratamento, paridade, concentração de P4 no d-4 (concentração de P4 dividida por mediana; P4<2,61 ng/ml e P4≥2,61 ng/ml) e suas devidas interações; e DEL, ECC, produção de leite, presença de CL no d-11, estação do ano durante o protocolo, número prévio de inseminações, inseminador, touro, e expressão de cio como covariáveis. As variáveis contínuas (concentração de P4 nos d-11, d-4, d0, e d10) foram analisadas utilizando o procedimento MIXED do SAS, com vacas dentro de lotes como efeito aleatório, e as variáveis incluídas nos modelos foram tratamento, paridade, presença de CL no d-11, e suas devidas interações, e DEL, ECC, produção de leite, estação do ano durante o protocolo, e expressão de cio como covariáveis. O procedimento GLM do SAS foi utilizado para determinar os efeitos das variáveis contínuas (concentração de P4 nos d-4, d0 e d10, ECC, produção de leite) na P/AI nos dias 32 e 60, e nas perdas gestacionais.

Aproximação Satterthwaite foi utilizada para determinar os graus de liberdade do denominador para os testes de efeitos fixos com a instrução aleatória contendo o efeito do grupo. Covariáveis que foram consideradas não significativas

com P entre 0,1 e 0,2 foram mantidas nos modelos, enquanto que covariáveis não significativas com P>0,2 foram removidas dos modelos estatísticos. Os resultados são expressos como médias ajustadas ± SEM para todas variáveis. Em todas as análises foram considerados resultados significativos quando P ≤0,05, e tendência quando P >0,05 e P ≤0,10.

## 3. Resultados

### 3.1. Animais e efeito de tratamento nas análises hormonais e na expressão de cio

Não foram detectadas diferenças entre tratamentos com relação a todas características dos animais, como produção média de leite (1CIDR= 43,8±0,6 kg/leite/dia vs. 2CIDR= 43,6±0,6 kg/leite/dia; P>0,2), ECC no início do protocolo de IATF (1CIDR= 2,8±0,02 vs. 2CIDR= 2,8±0,02; P>0,2), DEL (1CIDR= 150,3±5,4 vs. 2CIDR= 147,7±5,6; P>0,2), presença de CL no início do protocolo [1CIDR= 51,0% (158/310) vs. 2CIDR= 49,1% (138/281); P>0,2], número de inseminações médias (1CIDR= 3,07±0,13 vs. 2CIDR= 3,07±0,13; P>0,2), número de lactações médio (1CIDR= 2,1±0,05 vs. 2CIDR= 2,1±0,05; P>0,2) (Tabela1).

**Tabela 1**. Características dos animais no início do protocolo.

| | Protocolo | | |
|---|---|---|---|
| **Item** | **1CIDR** | **2CIDR** | **Valor de *P*** |
| **Produção Leiteira** | **43,8 ± 0,6 kg/dia** | **43,6 ± 0,6 kg/dia** | **>0,2** |
| **ECC no d-11** | **2,8 ± 0,02** | **2,8 ± 0,02** | **>0,2** |
| **DEL** | **150,3 ± 5,4 dias** | **147,7 ± 5,6 dias** | **>0,2** |
| **CL no d-11** | **51,0%** | **49,1%** | **>0,2** |
| **Nº de IAs** | **3,07 ± 0,13** | **3,07 ± 0,13** | **>0,2** |
| **Nº de Lactações** | **2,1 ± 0,05** | **2,1 ± 0,05** | **>0,2** |

A concentração de P4 no início do protocolo de IATF (d-11) foi similar entre tratamentos (1CIDR= 4,2±0,4 ng/ml vs. 2CIDR= 4,5±0,4 ng/ml; P=0,6) (Tabela 2).

A P4 no dia da aplicação da 1ª dose de PGF2α (d-4) (1CIDR= 3,5±0,2 ng/ml vs. 2CIDR= 3,8±0,2 ng/ml; P=0,26) também não diferiu entre tratamentos (Tabela 2). No entanto houve uma interação (P=0,04) entre presença de CL no d-11 e tratamento com relação a concentração de P4 no d-4 (vacas sem CL no início do protocolo apenas; 1CIDR= 2,7±0,3 ng/ml vs. 2CIDR= 3,6±0,3 ng/ml; P=0,02), onde vacas que não apresentavam CL no início do protocolo de IATF tratadas com 2CIDR apresentaram um acréscimo na P4 (Tabela 3), no entanto em vacas que continham CL em um de seus ovários não foi detectada diferença.

Concentração de P4 10 dias pós IA (d10) (1CIDR= 4,6±0,5 ng/ml vs. 2CIDR= 4,0±0,5 ng/ml; P=0,39) não resultou em diferenças por tratamento (Tabela 2).

Porém um efeito de tratamento foi observado com relação a concentração de P4 no dia da IA (d0) (1CIDR= 0,10±0,02 ng/ml vs. 2CIDR= 0,22±0,03 ng/ml; P=0,002), onde vacas tratadas (2CIDR) apresentavam maior P4 (Tabela 2).

**Tabela 2.** Concentração de P4 por tratamento

| | **Protocolo** | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Item** | **1CIDR** | **2CIDR** | **N** | **Valor de *P*=** |
| **P4 d-11** | **4,2 ± 0,4ng/ml** | **4,5 ± 0,4ng/ml** | **117** | **0,6** |
| **P4 d-4** | **3,5 ± 0,2ng/ml** | **3,8 ± 0,2ng/ml** | **351** | **0,26** |
| **P4 d0** | **0,10 ± 0,02ng/ml** | **0,22 ± 0,03ng/ml** | **214** | **0,002** |
| **P4 d10** | **4,6 ± 0,5ng/ml** | **4,0 ± 0,5ng/ml** | **72** | **0,39** |

**Tabela 3.** Interação entre presença de CL no d-11 e tratamento na concentração de P4 no dia da aplicação da 1ª Prostaglandina

| | **Presença de CL no d-11** | | |
|---|---|---|---|
| **Item** | **sem CL** | **com CL** | **Valor de *P*=** |
| **1CIDR** | **2,7 ± 0,3 ng/ml** | **4,3 ± 0,3 ng/ml** | ***<0,0001*** |
| **2 CIDR** | **3,6 ± 0,3 ng/ml** | **4,0 ± 0,3 ng/ml** | ***0,34*** |
| **Valor de *P*=** | ***0,02*** | ***0,52*** | |

### 3.2. Efeitos de tratamento na fertilidade dos animais

Efeitos de tratamento não foram identificados na expressão de cio dos animais submetidos à IATF (1CIDR= 76,5% vs. 2CIDR= 75,0%; P=0,67). A expressão de cio influenciou a fertilidade dos animais submetidos à IATF tanto no d32 [Cio= 29,9% (118/404) vs. Não Cio= 5,8% (6/122); P<0,0001] como no d60 [Cio= 26,5% (109/403) vs. Não Cio= 5,4% (5/122); P<0,0001].

O tratamento não alterou a fertilidade dos animais no d32 e no d60, assim como não influenciou nas perdas gestacionais entre d32 e d60 (Tabela 4).

**Tabela 4**. Efeito de tratamento na P/IA em ambos diagnósticos e nas perdas gestacionais

| | **Protocolo** | | |
|---|---|---|---|
| **Item** | **1CIDR** | **2CIDR** | **Valor de *P*=** |
| **P/IA (dg1)** | **26,9%(81/310)** | **22,5%(65/284)** | **0,24** |
| **P/IA (dg2)** | **23,3%(74/310)** | **18,9%(57/283)** | **0,23** |
| **Perda de gestação** | **11,5%(7/81)** | **12,4% (7/64)** | **0,86** |

Foi detectada tendência para interação entre a concentração de P4 no d-4 e ordem na P/IA aos 32d (Tabela 5), e aos 60d (Tabela 6). Incluindo na análise estatística apenas os animais que apresentaram cio, foi detectada interação entre a concentração de P4 no d-4 e ordem na P/IA aos 32d (Tabela 7), e aos 60d (Tabela 8). A partir destas análises conclui-se que primíparas que apresentavam P4 maior que a mediana no d-4 obtiveram maior fertilidade, enquanto que em multíparas a concentração de P4 não interferiu na P/IA.

**Tabela 5**. Tendência de interação (P=0,06) entre P4 no d-4 e paridade na P/IA aos 32d

| | **P4 d-4** | | |
|---|---|---|---|
| **Item** | **P4<2,61ng/ml** | **P4≥2,61ng/ml** | **Valor de *P*=** |
| **Primípara** | **18,3%(16/69)** | **40,1%(28/63)** | **0,007** |
| **Multípara** | **16,7%(21/107)** | **19,3%(30/113)** | **0,68** |
| **Valor de *P*=** | **0,83** | **0,009** | |

**Tabela 6.** Tendência de interação (P=0,06) entre P4 no d-4 e paridade na P/IA aos 60d

| | **P4 d-4** | | |
|---|---|---|---|
| **Item** | **P4<2,61ng/ml** | **P4≥2,61ng/ml** | **Valor de *P*=** |
| **Primípara** | **18,1%(14/69)** | **39,2%(27/63)** | **0,008** |
| **Multípara** | **13,3%(19/107)** | **15,9%(27/113)** | **0,67** |
| **Valor de *P*=** | **0,50** | **0,003** | |

**Tabela 7.** Interação (P=0,04) entre P4 no d-4 e paridade na P/IA aos 32d (somente animais que apresentaram cio estão incluídos na análise estatística)

| | P4 d-4 | | |
|---|---|---|---|
| **Item** | **P4<2,61ng/ml** | **P4≥2,61ng/ml** | **Valor de *P*=** |
| **Primípara** | **31,9%(13/50)** | **62,4%(24/42)** | **0,001** |
| **Multípara** | **30,6%(15/67)** | **37,0%(21/72)** | **0,40** |
| **Valor de *P*=** | **0,90** | **0,005** | |

**Tabela 8.** Interação (P=0,01) entre P4 no d-4 e paridade na P/IA aos 60d (somente animais que apresentaram cio estão incluídos na análise estatística)

| | P4 d-4 | | |
|---|---|---|---|
| **Item** | **P4<2,61ng/ml** | **P4≥2,61ng/ml** | **Valor de *P*=** |
| **Primípara** | **29,7%(13/50)** | **63,2%(24/42)** | **0,0003** |
| **Multípara** | **28,2%(14/67)** | **33,2%(19/72)** | **0,49** |
| **Valor de *P*=** | **0,85** | **0,0008** | |

Ao se analisar a probabilidade de prenhez por concentração de P4 no d-4, observou-se efeito linear em primíparas e nenhum efeito em multíparas. Portanto em primíparas quanto maior a P4 no d-4 maior a probabilidade de prenhez, tanto no d32 (P=0,04) (Figura 3) como no d60 (P=0,02) (Figura 4), porém nas multíparas a P4 no d-4 não influenciou a probabilidade de prenhez em ambos diagnósticos de gestação (d32: P= 0,34; d60: P=0,32).

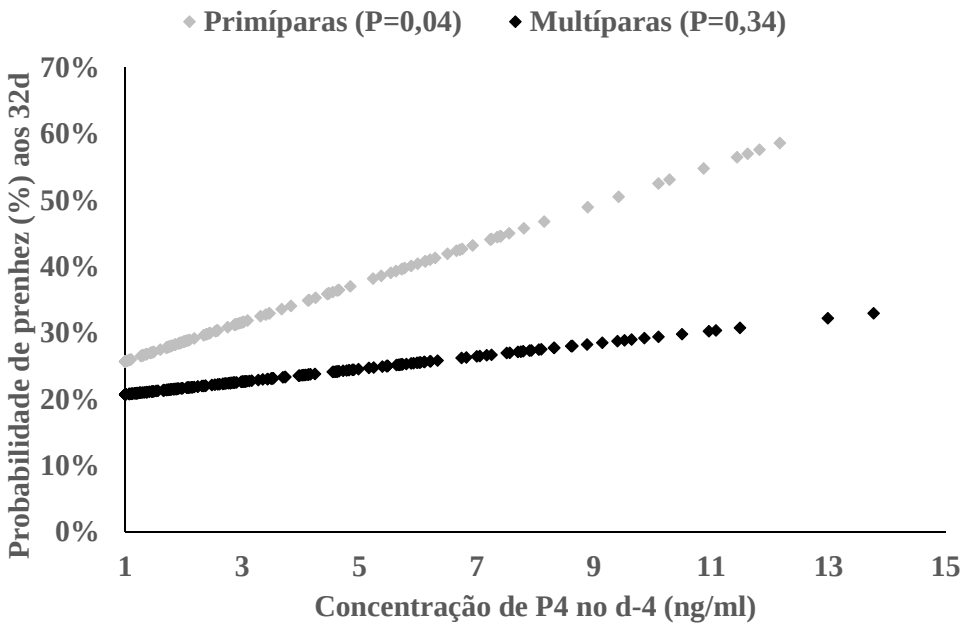


**Figura 3.** Probabilidade de prenhez aos 32d por concentração de P4 no d-4 em primíparas e multíparas

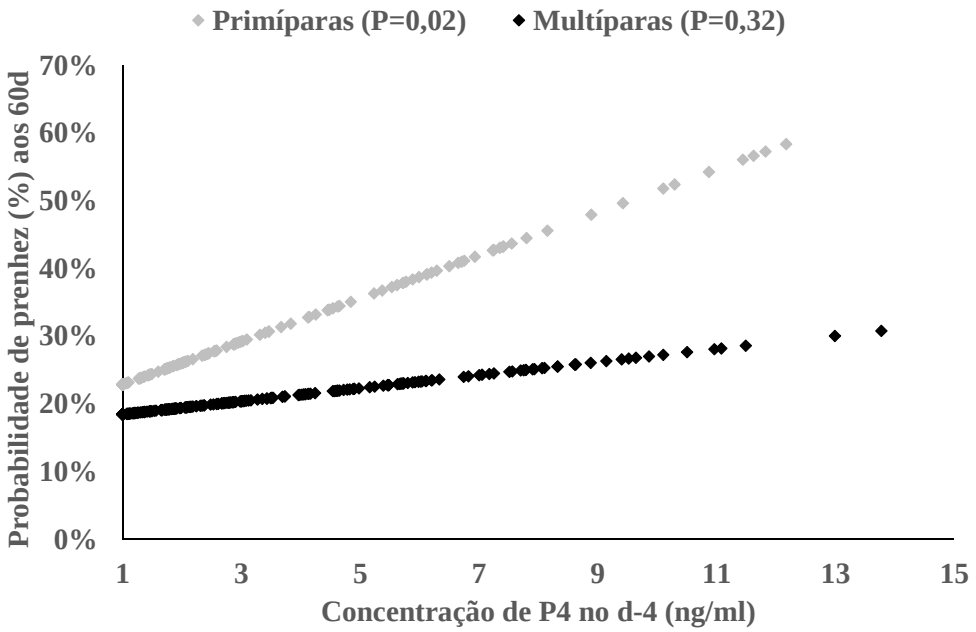


**Figura 4.** Probabilidade de prenhez aos 60d por concentração de P4 no d-4 em primíparas e multíparas

A probabilidade de prenhez por concentração de P4 após a IA (d10) mostrou efeito linear da concentração de P4 na fertilidade, onde quanto maior a P4 no d10

maior a probabilidade de prenhez dos animais tanto no d32 (P=0,0004) como no d60 (P=0,0004) (Figura 5).

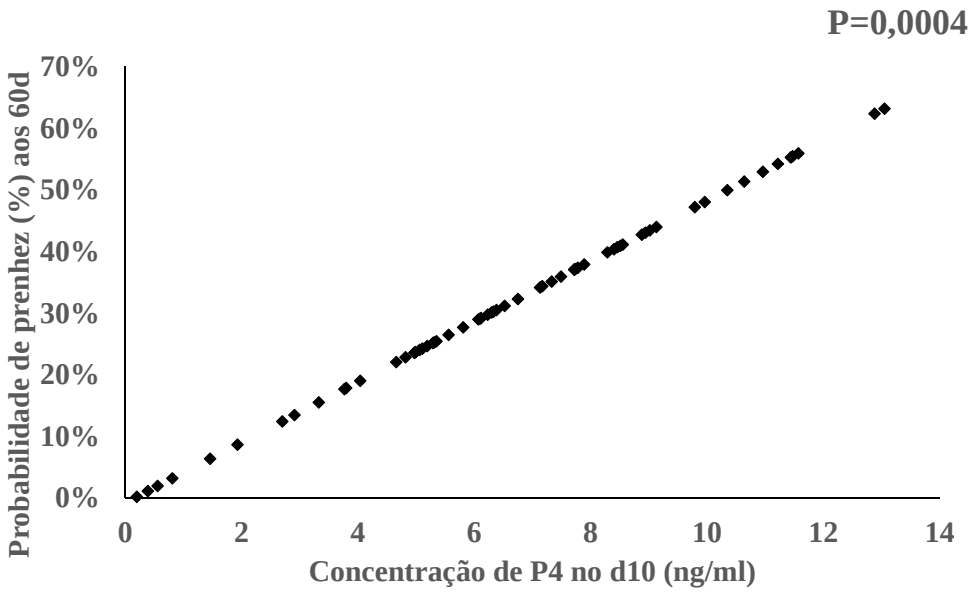


**Figura 5.** Probabilidade de prenhez no d60 por concentração de P4 após a IA

## 4. Discussão

O presente estudo teve por objetivo avaliar a resposta dos animais à suplementação de P4 durante o desenvolvimento do folículo ovulatório. Nossa hipótese é a de que com suplementação haveria maior concentração de P4 durante o protocolo de IATF, assim melhorando a fertilidade dos animais. Diversos estudos já relataram a suplementação de P4 durante protocolo de IATF, com resultados variados, alguns relatando melhora na fertilidade (SANCHES, 2013; EL-ZARKOUNY et al., 2004a; MELENDEZ et al., 2006; STEVENSON et al., 2006; BISINOTTO et al., 2013, 2015b), e alguns não apresentando efeito algum (EL-ZARKOUNY et al., 2004b; GALVAO et al., 2004; BISINOTTO et al., 2015c), porém esta é a primeira vez em que é relatada a suplementação de P4 durante um protocolo a base de E2 e P4 com uma aplicação de GnRH em seu início.

No início do protocolo de IATF todos animais se apresentavam em condições homogêneas (como exemplo, semelhanças com relação a concentração plasmática de P4, número de inseminações prévias, produção leiteira, ECC, DEL,

presença de CL, número médio de lactações, relação de primíparas e multíparas) dentro de seus respectivos grupos (1CIDR ou 2CIDR).

A suplementação com 1 CIDR a mais no grupo tratado não elevou a concentração de P4 no meio do protocolo (d-4), ao contrário do que LIMA et al., 2009, BISINOTTO et al., 2015c, e CERRI et al., 2009b reportaram, onde o acréscimo de 1 CIDR aumenta a concentração de P4 durante o protocolo. LIMA et al., 2009 observaram aumento na taxa de 0,9 ng/ml de P4 por CIDR adicionado ao protocolo, enquanto que BISINOTTO et al., 2015c relataram aumento de aproximadamente 1,3 ng/ml com utilização do CIDR, e CERRI et al., 2009b mostraram aumento entre 0,65 e 0,8 ng/ml. Apesar de não ter havido efeito de tratamento, uma interação (P=0,04) foi detectada entre tratamento e presença de CL no d-11 influenciando a concentração de P4 no d-4, onde animais sem CL do Grupo 2CIDR apresentaram maior P4 que animais sem CL do Grupo 1CIDR, porém em animais com CL nenhuma diferença foi observada. Este resultado portanto, entra em acordo com o achado de LIMA et al., 2009, ou seja, um aumento de 0,9 ng/ml de P4 com adição de 1 CIDR a mais. No trabalho citado foram utilizadas tanto vacas com CL no início da sincronização como vacas sem CL (LIMA et al., 2009), contudo no presente estudo o resultado da suplementação apareceu apenas em vacas sem CL.

Efeito de tratamento foi observado com relação a concentração de P4 no dia da IA (d0), onde vacas tratadas (2CIDR) apresentavam maior concentração de P4. BISINOTTO et al. 2013 relataram que a concentração de P4 no momento da IA pode ser alterada pela diferença na concentração da própria P4 durante o desenvolvimento do folículo ovulatório (Baixa P4= 0,51± 0,27 ng/ml vs. Alta P4= 3,40± 0,25 ng/ml), onde vacas com maior P4 durante a sincronização também apresentam maior P4 na IA (Baixa P4= 0,19 ng/ml vs. Alta P4= 0,31 ng/ml; P= 0,02). Porém em outro estudo BISINOTTO et al., 2015c não relataram efeito da suplementação de P4 durante a sincronização de estro e a concentração de P4 no dia da IA (Controle= 0,13± 0,02 vs. 1CIDR= 0,17± 0,03 ng/ml), apesar da diferença numérica. Os resultados na literatura são inconsistentes ao se relacionar a P4 durante desenvolvimento folicular e P4 no dia da IA, e o mecanismo pelo qual a concentração de P4 durante o protocolo de sincronização de estro influencia na P4 no dia da IA não é elucidado até o momento.

A concentração de P4 pós IA (d10) não foi afetada por tratamento, de acordo com alguns trabalhos (LIMA et al., 2009; CERRI et al., 2011a, 2011b), porém ao contrário de outros achados (MELENDEZ et al., 2006; CHEBEL et al., 2008), onde a suplementação com P4 influencia na concentração de P4 pós IA. CHEBEL et al., 2008 demonstraram que este aumento de P4 pós IA em vacas suplementadas com CIDR é devido a um aumento na taxa de sincronização das vacas tratadas, e não devido a diferenças dos folículos expostos a diferentes concentrações de P4 durante desenvolvimento. A semelhante concentração de P4 pós IA em ambos grupos pode ser consequência da não influência da suplementação com P4 no diâmetro folicular (COLAZO et al., 2013; DEWEY et al., 2010), embora no presente estudo não terem sido avaliados os ovários imediatamente antes da IA.

Com relação a fertilidade dos animais, os tratamentos não diferiram em nenhum parâmetro, tendo expressão de estro, P/IA aos 32d e aos 60d, e perdas gestacionais entre 32d e 60d semelhantes. Existem diversos trabalhos que relataram a suplementação exógena de P4 durante o desenvolvimento folicular em vacas leiteiras, alguns autores observaram melhora na fertilidade (SANCHES, 2013; EL-ZARKOUNY et al., 2004a; MELENDEZ et al., 2006; STEVENSON et al., 2006), e outros não detectaram diferenças (EL-ZARKOUNY et al., 2004b; GALVAO et al., 2004; BISINOTTO et al., 2015c). Estas inconsistências de resultados podem derivar de vários fatores, como presença ou não de CL no início dos tratamentos e tipos de protocolos de sincronização utilizados. Por exemplo, assim como em nosso estudo, LIMA et al., 2009, GALVÃO et al., 2004 utilizaram ECP como estímulo ovulatório e não encontraram benefícios na fertilidade quando animais são suplementados com P4, porém quando o estímulo ovulatório é GnRH alguns autores observaram aumento na prenhez (MELENDEZ et al., 2006; CHEBEL et al., 2008; BISINOTTO et al., 2013, 2015b). Dois fatores podem explicar as diferenças nas respostas quando ECP ou GnRH são utilizados: a concentração de P4 próxima a ovulação e o mecanismo de ação diferente dos hormônios. A concentração de P4 próxima à IA que afeta a fertilidade dos animais quando ECP ou GnRH são utilizados como agente indutor da ovulação são diferentes. PEREIRA et al., 2013b observaram que a fertilidade é afetada quando a concentração de P4 é maior que 0,1 ng/ml no dia da IA ao se utilizar ECP, porém outros autores relatam valores como 0,24 ng/ml

(SANTOS et al., 2010b), 0,4 ng/ml (BRUSVEEN et al., 2009; GIORDANO et al., 2012) e 0,5 ng/mL (MARTINS et al., 2011a, 2011b) quando GnRH é utilizado. Com relação ao mecanismo de ação, o ECP atua no hipotálamo, enquanto que o GnRH atua diretamente na hipófise para induzir a liberação de LH. Ainda, PEREIRA et al., 2013a sugeriram que alguns aspectos do protocolo à base de E2 e P4, cujo estímulo ovulatório é o ECP, parecem reduzir os efeitos negativos da baixa concentração de P4 durante o crescimento do folículo dominante. Com relação à presença de CL no início do protocolo, SANCHES, 2013 relatou melhora da fertilidade em animais sem CL com maior suplementação exógena de P4, em um protocolo de sincronização de estro cujo estímulo ovulatório utilizado foi ECP. BISINOTTO et al., 2013 encontraram resposta semelhante em animais sem CL no início da sincronização de estro quando o estímulo ovulatório utilizado foi GnRH. Porém quando os animais apresentam CL no início do protocolo de IATF, a adição de 1 CIDR não mostra aumento da fertilidade (BISINOTTO et al., 2015c).

DENICOL et al., 2012 anteriormente sugeriram que tratamento com adição de CIDR durante a sincronização de estro não afeta fertilidade devido as altas concentrações de P4 dos animais (P4> 3 ng/ml). No presente estudo a concentração de P4 no d-4 foi de 3,5± 0,2 ng/ml no grupo 1CIDR e 3,8± 0,2 ng/ml no grupo 2CIDR, talvez por isto não tenha sido detectada influência de tratamento na P/IA. BISINOTTO et al., 2015b porém mostram que uma concentração mínima de 2,0 ng/ml durante o desenvolvimento do folículo ovulatório é necessária para otimizar a fertilidade de vacas Holandesas (P4< 2 ng/ml= 29,4%; P4≥ 2 ng/ml= 55,3%; somente vacas suplementadas com P4 foram utilizadas nas análises). Talvez por isso não detectamos interação entre tratamento e presença de CL no d-11 na P/IA, já que independentemente de tratamento e presença de CL, ambos grupos experimentais apresentaram P4> 2,0 ng/ml no d-4.

Aos 32d e 60d foram detectadas tendências para interação entre P4 no d-4 e ordem na P/IA, porém ao se analisar somente animais que apresentaram estro, houve de fato interação entre P4 no d-4 e ordem na P/IA, onde primíparas que apresentavam P4 maior que a mediana no d-4 obtiveram maior fertilidade, enquanto que em multíparas a concentração de P4 não interferiu na P/IA. Ao se analisar a probabilidade de prenhez por concentração de P4 no d-4, observou-se efeito linear

da concentração de P4 em relação a P/IA nas primíparas tanto no d32 (P=0,04) como no d60 (P=0,02), porém nas multíparas a P4 não influenciou a probabilidade de prenhez em ambos diagnósticos de gestação (d32: P= 0,34; d60: P=0,32). Ao analisarmos a Figura 3 e a Figura 4 observamos que sob ação das mesmas concentrações de P4, a probabilidade de prenhez é maior em primíparas em comparação à multíparas. Esses resultados mostram que primíparas podem ser mais sensíveis ao aumento da concentração de P4, refletindo em maior fertilidade. De fato, SOUZA et al., 2008 observaram que primíparas que receberam duplo Ovsynch, estratégia a qual aumenta concentração de P4 durante o desenvolvimento do folículo dominante, responderam melhor ao tratamento que multíparas, refletindo em maior fertilidade. Realmente foi recentemente demonstrado que primíparas tratadas com 2 CIDRs apresentaram maior P4 que multíparas tratadas (primíparas= 3,60 ng/ml vs. multíparas= 2,33 ng/ml), fator este que melhora fertilidade (PEREIRA et al., 2013a, 2015) porém em animais não tratados tal diferença não foi notada (BISINOTTO et al., 2015b).

A probabilidade de prenhez por concentração de P4 após a IA (d10) mostrou efeito linear, onde quanto maior a P4 pós IA maior a probabilidade de prenhez dos animais tanto no d32 (P=0,0004) como no d60 (P=0,0004). Este resultado era esperado, pois sabe-se que elevadas concentrações pós IA de P4 têm sido associadas com maior alongamento embrionário (GARRETT et al., 1988; SATTERFIELD et al., 2006; CARTER et al., 2008), com aumento na produção de interferon-tau (MANN & LAMMING, 2001), e com maiores taxas de prenhez em bovinos (DEMETRIO et al., 2007; STRONGE *et al.*, 2005; McNEILL *et al.*, 2006). Por outro lado, baixas concentrações de P4 após a IA são relacionadas com baixa fertilidade em vacas (LAMMING et al., 1989). De fato, PEREIRA et al., 2014 observaram que a concentração de P4 7 dias pós IA tendeu a afetar a P/IA, sendo que quanto maior a P4 melhor a fertilidade. Ainda, LIMA et al., 2009 mostraram que vacas prenhes apresentam maiores concentrações de P4 17 e 24 dias pós IA em comparação a vacas não prenhes (17 pós IA: 3,95 ng/ml vs. 3,39 ng/mL / 24 pós IA: 6,04 ng/ml vs. 5,21 ng/ml).

A P4 no d0 não afetou a prenhez dos animais, talvez devido à alta porcentagem de animais com baixas concentrações de P4, menor que a concentração

relatada na literatura que afeta a P/IA em animais leiteiros em lactação submetidos a protocolo à base de E2 e P4 (P4< 0,1 ng/ml; PEREIRA et al., 2013b). No presente estudo 74,6% (167/224) apresentavam concentração de P4<0,1 ng/ml.

A expressão de estro afetou a fertilidade dos animais submetidos à IATF tanto no d32 [Cio= 29,9% (118/404) vs. Não Cio= 5,8% (6/122); P<0,0001] como no d60 [Cio= 26,5% (109/403) vs. Não Cio= 5,4% (5/122); P<0,0001]. Vários relatos demonstram efeito positivo da expressão de cio na prenhez de bovinos em diversos protocolos de sincronização de estro distintos (PEREIRA et al., 2013a, 2014; CERRI et al., 2004; GALVAO et al., 2004; HILLEGASS et al., 2008; BISINOTTO et al., 2013, 2015b, 2015c). O fator predominante que melhora a fertilidade de animais que expressam cio deve ser a maior concentração de E2. MANN & LAMMING, 2000 sugeriram que quanto menor a concentração de E2 durante o proestro, menor é a expressão de receptores de P4 no endométrio, o que pode levar a liberação prematura de PGF2α, assim prejudicando a manutenção da gestação.

## 5. Conclusões

Suplementação com P4 durante protocolo de sincronização de estro à base de E2 e P4 com aplicação de GnRH em seu início foi eficaz em aumentar a concentração de P4 somente em animais sem CL, porém isto não refletiu em melhorias na fertilidade.

Quanto maior a concentração de P4 durante desenvolvimento do folículo dominante maior a fertilidade em vacas primíparas, efeito não observado em multíparas, sugerindo que primíparas são mais sensíveis ao aumento de P4. Em multíparas a concentração de P4 pode não ser o único fator que impacta na fertilidade.

Ainda, a expressão de estro mostra-se fundamental na fertilidade de vacas leiteiras em lactação.

## 6. Referências bibliográficas

BISINOTTO, R. S., E. S. RIBEIRO, F. S. LIMA, N. MARTINEZ, L. F. GRECO, L. F. BARBOSA, P. P. BUENO, L. F. SCAGION, W. W. THATCHER, J. E. P. SANTOS. **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.* 96: 2214–2225. 2013.

BISINOTTO, R.S., L. O. CASTRO , M. B. PANSANI , C. D. NARCISO , N. MARTINEZ , L. D. P. SINEDINO, T. L. C. PINTO, N. S. VAN DE BURGWAL, H. M. BOSMAN, R. S. SURJUS, W. W. THATCHER, J. E. P. SANTOS. **Progesterone supplementation to lactating dairy cows without a corpus luteum at initiation of the Ovsynch protocol.** *Journal of Dairy Science.* 98: 2515–2528. 2015b.

BISINOTTO, R.S., M.B. PANSANI, L.O. CASTRO, C.D. NARCISO, L.D.P. SINEDINO, N. MARTINEZ, P.E. CARNEIRO, W.W. THATCHER, J.E.P. SANTOS. **Effect of progesterone supplementation on fertility responses of lactating dairy cows with corpus luteum at the initiation of the Ovsynch protocol.** *Theriogenology* 83: 257–265. 2015c.

BISINOTTO, R.S.; E.S. RIBEIRO, F.S. LIMA, N. MARTINEZ, L.F GRECO, L.F.S.P. BARBOSA, P.P. BUENO, L.F.S. SCAGION, W.W. THATCHER, J.E.P. SANTOS. **Targeted progesterone supplementation improves fertility in lacting dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol.** *Journal of Dairy Science*. 96: 1-12. 2013.

BISINOTTO, R.S.; R.C. CHEBEL, J.E.P. SANTOS. **Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 93: 3578-3587. 2010a.

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

BRUSVEEN, D. J., A. H. SOUZA, M. C. WILTBANK. **Effects of additional prostaglandin F2α and estradiol-17β during Ovsynch in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 92:1412–1422. 2009.

CARTER F., N. FORDE, P. DUFFY, M. WADE, T. FAIR, M.A. CROWE, A.C. EVANS, D.A. KENNY, J.F. ROCHE, P. LONERGAN. **Effect of increasing progesterone concentration from day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers.** *Reprod. Fertil. Dev.*, 20:368-375. 2008.

CERRI, R. L. A., H. M. RUTIGLIANO, R. G. S. BRUNO, J. E. P. SANTOS. **Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts.** *Animal Reproduction Science.* 110: 56–70. 2009b.

CERRI, R. L. A., R. C. CHEBEL, F. RIVERA, C. D. NARCISO, R. A. OLIVEIRA, J. E. P. SANTOS. **concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: I. ovarian and embryonic responses.** *Journal of Dairy Science*. 94: 3342–3351. 2011a.

CERRI, R. L. A., R. C. CHEBEL, F. RIVERA, C. D. NARCISO, R. A. OLIVEIRA, M. AMSTALDEN, G. M. BAEZ-SANDOVAL, L. J. OLIVEIRA, W. W. THATCHER, J. E. P. SANTOS. **Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses.** *Journal of Dairy Science*. 94: 3352–3365. 2011b.

CERRI, R.L., H.M. RUTIGLIANO, R.C. CHEBEL, J.E.P. SANTOS. **Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows.** *Reproduction.* 137: 813–823. 2009a.

CHEBEL, R. C., M. J. AL-HASSAN, P. M. FRICKE, J. E. SANTOS, C. A. MARTEL, J. S. STEVENSON, R. GARCIA, R. L. AX, F. MOREIRA. **Supplementation of progesterone via CIDR inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 91(Suppl. 1):257. (Abstr.). 2008.

COLAZO M.G., A. DOUREY, R. RAJAMAHENDRAN, D.J. AMBROSE. **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.* 79: 833–41. 2013.

DEMETRIO D.G., R.M. SANTOS, C.G. DEMETRIO, J.L.M. VASCONCELOS. **Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows.** *Journal of Dairy Science.* 90: 5073–5082. 2007.

DENICOL, A.C., G. LOPES JR., L.G.D. MENDONÇA, F.A. RIVERA, F. GUAGNINI, R.V. PEREZ, J.R. LIMA, R.G.S. BRUNO, J.E.P. SANTOS, R.C. CHEBEL. **Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 95: 1794–1806. 2012.

DEWEY S.T., L.G. MENDONCA, G. LOPES JR., F.A. RIVERA, F. GUAGNINI , R.C. CHEBEL. **Resynchronization strategies to improve fertility in lactating dairy cows utilizing a presynchronization injection of GnRH or supplemental progesterone: I. Pregnancy rates and ovarian responses.** *Journal of Dairy Science.* 93: 4086–95. 2010.

EL-ZARKOUNY S.Z., J.A. CARTMILL, B.A. HENSLEY, J.S. STEVENSON. **Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone.** *Journal of Dairy Science.* 87: 1024–37. 2004a.

EL-ZARKOUNY, S. Z., & J. S. STEVENSON. **Resynchronizing estrus with progesterone or progesterone plus estrogen in cows of unknown pregnancy status.** *Journal of Dairy Science.* 87: 3306–3321. 2004b.

GALVAO, K. N., J. E. P. SANTOS, S. O. JUCHEM, R. L. A. CERRI, A. C. COSCIONI, M. VILLASENOR. **Effect of addition of a progesterone intravaginal insert to a timed insemination protocol using estradiol cypionate on ovulation rate, pregnancy rate, and late embryonic loss in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 87: 3508– 3517. 2004.

GARRETT J.E., R.D. GEISERT, M.T. ZAVY, G.L. MORGAN. **Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle.** *Journal Reproduction and Fertility*. 84: 437-446. 1998.

GIORDANO, J. O., M. C. WILTBANK, J. N. GUENTHER, R. PAWLISCH, S. BAS, A. P. CUNHA, P. M. FRICKE. **Increased fertility in lactating dairy cows resynchronized with Double-Ovsynch compared with**

**Ovsynch initiated 32 d after timed artificial insemination.** *Journal of Dairy Science.* 95: 639–653. 2012.

KIRBY, C. J., M. F. SMITH, D. H. KEISLER, M. C. LUCY. **Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained release bovine somatotropin.** *Journal of Dairy Science.* 80: 273–285. 1997.

LAMMING, G.E., A.O. DARWASH, G.E. MANN. **Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality.** *Journal of Reproduction and Fertility*. 37(Suppl): 245–252. 1989.

LIMA, J. R., F. A. RIVERA, C. D. NARCISO, R. OLIVEIRA, R. C. CHEBEL, J. E. P. SANTOS. **Effect of increasing amounts of supplemental P4 in a timed artificial insemination protocol on fertility of lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 92: 5436–5446. 2009.

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

LUCY, M.C., S. MCDOUGALL, D.P. NATION. **The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems.** *Animal Reproduction Science.* 82-83: 495-512. 2004.

MANN G.E., G.E. LAMMING. **Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows.** *Reproduction*, 121: 175-180. 2001.

MARTINS, J. P. N., R. K. POLICELLI, J. R. PURSLEY. **Luteolytic effects of cloprostenol sodium in lactating dairy cows treated with G6G/Ovsynch.** *Journal of Dairy Science.* 94: 2806–2814.2011b.

MARTINS, J. P. N., R. K. POLICELLI, L. M. NEUDER, W. RAPHAEL, J. R. PURSLEY. **Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F2α of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* 94: 2815–2824. 2011a.

MCNEILL R.E., M.G. DISKIN, J.M. SREENAN, D.G. MORRIS. **Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows.** *Theriogenology*. 65: 1435-1441. 2006.

MELENDEZ, P., G. GONZALEZ, E. AGUILAR, O. LOERA, C. RISCO, L. F. ARCHBALD. **Comparison of two estrus-synchronization protocols and timed artificial insemination in dairy cattle.** *Journal of Dairy Science*. 89: 4567–4572. 2006.

MIHM, M., A. BAGUISI, M.P. BOLAND, J.F. ROCHE. **Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers.** *Journal Reproduction and Fertility.* 102: 123–130. 1994.

NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC. 2001.

PEREIRA M.H.C.; C.P. SANCHES, T.G. GUIDA, A.D.P. RODRIGUES, F.L. ARAGON, M.B. VERAS, P.T. BORGES, M.C. WILTBANK, J.L.M. VASCONCELOS. **Timing of prostaglandin F2α treatment in an estrogen-based protocol for timed artificial insemination or timed embryo transfer in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 96: 2837-46. 2013b.

PEREIRA, M. H., A. D. RODRIGUES, R. J. DE CARVALHO, M. C. WILTBANK, J. L. VASCONCELOS. **Increasing length of an estradiol and progesterone timed artificial insemination protocol decreases pregnancy losses in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 97: 1454–1464. 2014.

PEREIRA, M.H.C., A.D.P. RODRIGUES, T. MARTINS, W.V.C. OLIVEIRA, P.S.A. SILVEIRA, M.C. WILTBANK, J.L.M. VASCONCELOS. **Timed Artificial Insemination Programs During Summer in Lactating Dairy Cows: Comparison of the 5-d Cosynch protocol with an Estrogen/Progesterone-based protocol**. *Journal of Dairy Science.* 96: 6904–6914. 2013a.

PEREIRA, M.H.C., M. C. WILTBANK , L. F. S. P. BARBOSA , W. M. COSTA JR. , M. A. P. CARVALHO , J. L. M. VASCONCELOS. **Effect of adding a gonadotropin-releasing-hormone treatment at the beginning and a second prostaglandin F2α treatment at the end of an estradiol-based protocol for timed artificial insemination in lactating dairy cows during cool or hot seasons of the year.** *Journal of Dairy Science.* 98: 947–959. 2015.

PURSLEY J.R., M.O. MEE, M.C. WILTBANK. **Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2α and GnRH.** *Theriogenology.* 44: 915-923. 1995.

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

RIVERA, F.A., L.G. MENDONCA, G. LOPES JR., J.E. SANTOS, R.V. PEREZ, M. AMSTALDEN, A. CORREA-CALDERON, R.C. CHEBEL. **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* 141: 333–342. 2011.

ROBERSON, M.S., M.W. WOLFE, T.T. STUMPF, R.J. KITTOK, J.E. KINDER. **Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of P4.** *Biology of Reproduction.* 41: 997–1003. 1989.

SANCHES, C.P. **Efeito do dispositivo de progesterona adicional durante protocolo de IATF e TETF a base de E2/P4 na fertilidade de vacas em lactação com baixa P4.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 71f. 2013.

SANGSRITAVONG, S., D.K. COMBS, R. SARTORI, M.C. WILTBANK. **High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17β in dairy cattle.** *Journal of Dairy Science*. 85: 2831–2842. 2002.

SANTOS, J.E.P., W.W. THATCHER, R.C. CHEBEL, R.L.A. CERRI, K.N. GALVAO. **The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs.** *Animal Reproduction Science.* 82–83: 513–535. 2004.

SANTOS, J.E.P.; C.D. NARCISO, F. RIVERA, W.W. THATCHER, R.C. CHEBEL. **Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed AI protocol on reproduction of dairy cows.** *Journal of Dairy Science*. 93: 2976–2988. 2010b.

SARTORI, R., J.M. HAUGHLAN, R.D. SHAVER, G.J.M. ROSA, M.C. WILTBANK. **Comparison of ovarian function and circulating steroids in**

**estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows.** *Journal of Dairy Science.* 87: 905–920. 2004.

SATTERFIELD M.C., F.W. BAZER, T.E. SPENCER. **Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus.** *Biology of Reproduction*. 75: 289-296. 2006.

SAVIO, J.D., W.W. THATCHER, G.R. MORRIS, K. ENTWISTLE, M. DROST, M. R. MATTIACCI. **Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intavaginal device on follicular turnover and fertility in cattle.** *Journal Reproduction and Fertility.* 98: 77-84. 1993.

SHAHAM-ALBALANCY A., Y. FOLMAN, M. KAIM, M. ROSENBERG, D. WOLFENSON. **Delayed effect of low progesterone on bovine uterine prostaglandin F2alfa secretion in the subsequent estrous cycle.** *Reproduction.* 122: 643-648, 2001.

SILVIA, W.J., G.S. LEWIS, J.A. MCCRACKEN, W.W. THATCHER, L. WILSON JR. **Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2α during luteolysis in ruminants.** *Biology of Reproduction.* 45: 655–663. 1991.

SOUZA, A.H., H. AYRES, R.M. FERREIRA, M.C. WILTBANK. **A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows.** *Theriogenology.* 70: 208-215. 2008.

STEVENSON J.S., J.R. PURSLEY, H.A. GARVERICK, P.M. FRICKE, D.J. KESLER, J.S. OTTOBRE. **Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch.** *Journal of Dairy Science.* 89: 2567–78. 2006.

STRONGE A.J., J.M. SREENAN, M.G. DISKIN, J.F. MEE, D.A. KENNY, D.G. MORRIS. **Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows.** *Theriogenology*. 64: 1212-1224. 2005.

VASCONCELOS, J.L.M., D.T. JARDINA, O.G. SÁ FILHO, F.L. ARAGON, M.B. VERAS. **Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropin-releasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows.** *Theriogenology.* 75(6): 1153-1160. 2011a.

VASCONCELOS, J.L.M., S. SANGSRITAVONG, S.J. TSAI, M.C. WILTBANK. **Acute reduction in serum progesterone concentration after feed intake in dairy cows.** *Theriogenology*. 60: 795–807. 2003.

WILTBANK, M.C., H. LOPEZ, R. SARTORI, S. SANGSRITAVONG, A. GUMEN. **Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism.** *Theriogenology*. 65: 17– 29. 2006.

# CAPÍTULO 3

## CONSIDERAÇÕES GERAIS E IMPLICAÇÕES

## 1. Considerações gerais e implicações

Primíparas apresentam resposta positivo ao aumento de P4 durante desenvolvimento do folículo ovulatório, efeito não observado em multíparas. Técnicas que possibilitem o aumento de P4 durante protocolo de IATF em primíparas devem ser aprimoradas e testadas, visando aumento da fertilidade nesta categoria animal.

Animais que não apresentam cio em resposta a um protocolo de sincronização de estro não devem ser inseminados e devem ser ressincronizados assim que possível, já que a expressão de cio mostra-se essencial na fertilidade dos animais submetidos à IATF.