EVANDRO DAVANÇO FERREIRA DE SOUZA

Efeito da progesterona injetável de longa ação na função luteínica e na taxa de concepção de vacas Holandesas de alta produção submetidas à IATF

São Paulo

2015

EVANDRO DAVANÇO FERREIRA DE SOUZA

**Efeito da progesterona injetável de longa ação na função luteínica e na taxa de concepção
de vacas Holandesas de alta produção submetidas à IATF**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2015

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP.

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3126
FMVZ

Souza, Evandro Davanço Ferreira de

Efeito da progesterona injetável de longa ação na função luteínica e na taxa de concepção de vacas Holandesas de alta produção submetidas à IATF / Evandro Davanço Ferreira de Souza . -- 2015.

68 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Progesterona. 2. IATF. 3. Vaca. 4. Holandesa. 5. Alta produção. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito da progesterona injetável de longa ação três dias após a IATF e na taxa de concepção de vacas de leite de alta produção inseminadas em tempo fixo", protocolado sob o nº 2926/2013, utilizando 600 (seiscentos) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, foi aprovado em reunião de 13/3/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Effect of long-acting injectable progesterone three days after FTAI and the conception rate of high yield cows inseminated in fixed time", protocol number 2926/2013, utilizing 600 (six hundred) bovine, under the responsibility Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, was approved in the meeting of day 3/13/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 20 de março de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUZA, Evandro Davanço Ferreira de

Título: Efeito da progesterona injetável de longa ação na função luteínica e na taxa de concepção de vacas Holandesas de alta produção submetidas à IATF

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A Deus e a Jesus Cristo por sempre me guiar e dar sustentação durante esta caminhada,

A minha esposa Catarine meu grande amor, companheira, que me impulsionou a buscar o meu melhor desde o primeiro momento que a vi,

Aos meus filhos, Lorena (minha flor) e Lorenzo (magrelo) minhas maiores motivações,

A minha mãe, exemplo de superação em diferentes momentos de nossas vidas e exemplo para outras,

Ao meu sogro (Paulo Roberto) e Sogra (Margareth) pela ajuda para concretização deste sonho,

Ao professor e posso dizer amigo Pietrão, por confiar em mim e proporcionar esta oportunidade.

Dedico

AGRADEÇO

*Primeiramente a **Deus e a Jesus Cristo** por iluminar-me e guiar-me em todos os momentos, não somente nas boas conquistas, mas principalmente nas difíceis e o ensinamentos que pude adquirir com seus ensinamentos.*

*A minha família **Catarine, Lorena e Lorenzo** o meu grande ponto de apoio, minha fortaleza para tudo que faço e penso em fazer, sempre penso em vocês, meu verdadeiro motivo para seguir adiante, cada vez mais. A vocês toda a minha gratidão e admiração. Amo vocês!*

*A toda a minha família, **Mãe, Sogros, Tios, Primos, Cunhados e Avós** pela contribuição que cada um deixou.*

*Ao meu pai **Juarez** e meu irmão **Henrique**, pelos exemplos deixados e estes jamais esquecerei.*

*Ao amigo **Prof. Pietro**, que tenho como exemplo de pessoa e profissional. Agradeço pela oportunidade, ensinamentos, paciência e confiança a mim creditada.*

*As amigas **Alessandra e Michele**, pelo apoio prestado e conselhos antes e durante o desenvolvimento do projeto, vocês foram importantes.*

*Aos amigos do **Comex, Ricardo, Paulo, Trevelin, Andreza, Renata e Thais** pela paciência e compreensão durante este período. Sem estas virtudes seria bem mais complicada a finalização deste sonho.*

*A **Ourofino Saúde Animal Ltda**, e seus fundadores **Norival e Jardel** por acreditarem neste projeto e deixarem que este se realizasse, meu muito obrigado!*

*A **Laís (Kokota)**, que foi fundamental para realização deste trabalho, sem a sua experiência, profissionalismo e foco seria muito mais difícil, quero expressar o meu muito obrigado!*

*Ao querido e admirado grande grupo do **VRA (Manoel, Bruna, Bruno Karboxy, Bruno Monteiro, Julia, Badá e Mili)** que de uma forma ou outra contribuíram muito para o meu*

desenvolvimento, deixo a vocês meu respeito e carinho e espero também de alguma maneira ter contribuído um pouco, que seja para cada um.

*Meu carinho e reconhecimento especial ao **Rodrigo Vasconcelos e Mariana Ortolan**, que apoiaram de forma intensiva realização deste sonho.*

*Também a querida **Harumi**, que com toda a sua paciência e boa vontade em ajudar, sempre me orientou para que não perdesse prazos e auxílio de ultima hora com os relatórios, sem tua ajuda nestes momentos não chegaria até aqui.*

*Aos profs. Dos quais convivi durante minha estada junto ao depto. **Mayra, Claudia, Camila, Marcilio, Visitin, Ricardo, Ed, Carla, André, Rubens, Binelli e Sartori**, meu muito obrigado pela contribuição tão fundamental de cada um.*

*As fazendas contribuintes e seus responsáveis, **Primavera (Arthur, Alexandre, Osni, Selma e João) Colorado (Sérgio, Sica, Rodrigo, Rodolfo e João) e Jida (Tiago, Maurilio e Edinho)** meu muito obrigado e gratidão.*

*Agradeço a **USP/FMVZ** por fazer parte da minha vida e do meu desenvolvimento profissional.*

E por fim, quero manifestar minha gratidão aos animais que participaram deste projeto, meu profundo respeito e afeto, sem vocês nada disso seria idealizado!

RESUMO

SOUZA, E. D. F. de. **Efeito da progesterona injetável de longa ação na função luteínica e na taxa de concepção de vacas Holandesas de alta produção submetidas à IATF.** [Effect of long-acting injectable progesterone in luteal function and conception rate of high producing Holstein cows submitted to TAI]. 2015. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A progesterona (P4) apresenta papel fundamental nos processos de estabelecimento e manutenção da gestação em fêmeas bovinas. A manipulação deste esteroide em momentos estratégicos durante programas de sincronização da ovulação pode aumentar o sucesso gestacional, especialmente em vacas leiteiras de alta produção devido a alta metabolização hepática de esteroides. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a administração de P4 injetável de longa ação (P4LA), associado ou não ao tratamento com hCG, sobre a função luteínica e taxa de concepção de vacas leiteiras de alta produção. Para tanto, três experimentos foram realizados. Experimento 1, 12 dias após a ovulação sincronizada (-24 h), 29 vacas da raça Holandesa em lactação (fêmeas com P4 plasmática inferior a 1ng/mL) receberam um implante auricular de norgestomet e 500µg Cloprostenol Sódico (i.m.). Após 24h (0h), as fêmeas foram aleatoriamente distribuídas em um de quatro grupos experimentais: Controle (n=8), fêmeas sem tratamento adicional; e P4LA-300 (n=7), P4LA-600 (n=7) e P4LA-900 (n=7), fêmeas tratadas com 300, 600 e 900 mg de P4LA i.m., respectivamente. A P4 plasmática foi determinada a cada 24h totalizando 216 h. Verificou-se interação entre tratamento e tempo ($P=0,002$). As fêmeas tratadas com 900 mg de P4LA apresentaram maior P4 circulante durante todo o período experimental, enquanto as fêmeas tratadas com 300 e 600 mg de P4LA apresentaram superioridade somente nas primeiras 24 e 48h após o tratamento, respectivamente. No experimento 2, 3 dias após o momento esperado da IATF (Dia 3), 75 fêmeas da raça Holandesa em lactação foram alocadas em um de quatro grupos experimentais: Controle (n=20), fêmeas sem tratamento adicional; P4LA-900 (n=18), fêmeas receberam 900mg de P4LA i.m.; hCG (n=19), fêmeas receberam 2.000UI de hCG i.m.; P4LA-900+hCG (n=18), fêmeas receberam ambos os tratamentos, concomitantemente. Após o tratamento, amostras de sangue foram coletadas (Dias 3, 5, 9, 13 e 17) e exames ultrassonográficos foram realizados (Dias 5, 9 e 13) para avaliar a concentração (ng/mL) plasmática de P4 e mensurar o volume do corpo lúteo (CL). Verificou-se interação entre o tratamento com P4LA-900 e tempo

($P=0,0001$) e entre o tratamento com hCG e tempo ($P=0,05$) para concentração de P4 plasmática. Os animais tratados com P4LA-900 apresentaram maior concentração de P4 nos Dias 5 e 9. Enquanto que animais tratados com hCG apresentaram maior concentração de P4 no Dia 9. Para o volume do CL observou-se interação entre o tratamento com hCG ($P=0,002$) e tempo. Animais tratados com hCG (P4LA-900+hCG e hCG) apresentaram maior volume do CL nos Dias 9 e 13 em relação aos grupos não tratados com hCG (controle e P4LA-900). No experimento 3, 982 vacas leiteiras da raça Holandesa previamente submetidas a IATF foram aleatoriamente distribuídas em um de quatro grupos experimentais, semelhantes aos descrito no Experimento 2 [Controle ($n=250$); P4LA-900 ($n=245$); hCG ($n=237$) e P4LA-900+hCG ($n=250$)]. A taxa de concepção aos 30 dias após IATF foi superior no grupo P4LA-900 ($P=0,002$). No entanto, nenhum efeito foi observado para o tratamento com hCG ($P = 0,20$) ou interação P4LA-900 e hCG ($P = 0,71$). As taxas de concepção aos 60 dias, bem como de perda gestacional entre 30 e 60 dias pós IATF não foram influenciadas pelos tratamentos (P4LA-900 ou hCG). Houve interação entre tratamento com P4LA-900 e fazenda sobre a taxas de concepção aos 60 dias ($P=0,09$). Ainda observou-se interação entre o tratamento P4LA-900 e a época do ano (quente vs. não quente), sobre as taxas de concepção aos 30 ($P = 0,04$) e aos 60 ($P = 0,07$) dias após a IATF. Verificou-se efeito positivo do tratamento com P4LA-900 durante a época quente do ano. Desta forma, conclui-se que o tratamento de com P4LA-900 em fêmeas de alta produção da raça Holandesa inseminadas em tempo fixo foi positivo para taxa de concepção aos 30 dias, principalmente durante a época quente do ano. O tratamento com hCG aumentou as concentrações de P4 após o tratamento, entretanto, não foram observados efeitos positivos na taxa de concepção.

Palavras chave: Progesterona. IATF. Vaca. Holandesa. Alta produção.

ABSTRACT

SOUZA, E. D. F. de. **Effect of long-acting injectable progesterone in luteal function and conception rate of high producing Holstein cows submitted to TAI.** [Efeito da progesterona injetável de longa ação na função luteínica e na taxa de concepção de vacas Holandesas de alta produção submetidas à IATF]. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Progesterone (P4) has a key role in the establishment and maintenance processes of pregnancy in cows. The modulation of this steroid at strategic times during ovulation synchronization programs can increase pregnancy success, especially in high-producing dairy cows. Therefore, the objective of this study was to evaluate the administration long-acting injectable P4 (P4LA) on luteal function and conception rate of high producing dairy cows. Therefore three experiments were performed. In Experiment 1, 12 days after synchronized ovulation (-24h), 29 Holstein cows in lactation (with plasma P4 less than 1 ng / mL) were given a norgestomet implant and 500µg Cloprostenol Sodium (i.m.). After 24 hours (0h), females were randomly assigned to one of four groups: control (n = 8), females without further treatment and P4LA-300 (n = 7), P4LA-600 (n = 7) and P4LA -900 (n = 7) females treated with 300, 600 and 900 mg P4LA i.m., respectively. After treatment, the plasma P4 was determined every 24 hours until 216 hours. There was an interaction between treatment and time (p = 0.002). The females treated with 900 mg of P4LA showed higher P4 concentration during the entire experimental period, while females treated with 300 and 600 mg had greater P4 concentration during the first 24 e 48 h after treatment, respectively. In experiment 2, three days after synchronized ovulation (Day 3), 75 female Holstein lactating were assigned to one of four groups: control (n = 20), females without further treatment; P4LA-900 (n = 18), females received 900mg of P4LA i.m.; hCG (n = 19), females received hCG 2.000UI im; P4LA-900 + hCG (n = 18), females received both treatments simultaneously. After treatment, blood samples were collected (Days 3, 5, 9, 13 and 17) and ultrasound examinations were conducted (Days 5, 9 and 13) to assess the concentration (ng/mL) plasma P4 and measure the body volume luteum (CL). There was interaction between treatment with P4LA-900 and time (P = 0.001) and treatment with hCG and time for plasma concentration of P4. Animals treated with P4LA-900 presented greater P4 concentration during Days 5 and 9. On the other hand, animals treated with hCG had greater P4 concentration on Day 9. For the CL volume, an interaction was observed between treatment with hCG and time (P=0,002). Animals treated with hCG (P4LA-900+hCG and hCG groups) resulted in greater CL volume during Days 9 and 13 compared to the experimental groups not

treated with hCG (Control and P4LA-900 groups). In experiment 3, 982 dairy Holstein cows previously submitted to FTAI were randomly assigned to one of four experimental groups, similar to those described in Experiment 2 [Control (n = 250); P4LA-900 (n = 245); hCG (n = 237) and P4LA-900 + hCG (n = 250)]. The conception rate after 30 days was higher in P4LA TAI-900 ($P = 0.002$), but no effect was seen with treatment with hCG ($P = 0.20$) or with P4LA + hCG interaction ($P = 0.71$). Conception rates at 60 days, as well as pregnancy loss between 30 and 60 days after TAI were not affected by treatments (P4LA-900 or hCG). There was an interaction between treatment and farm on conception rates at 30 ($P = 0.001$) and 60 days ($P = 0.006$). Still there was interaction between treatment with P4LA-900 and period of the year (warm vs not hot) on conception rates at 30 ($P = 0.04$) and 60 ($P = 0.07$) days after TAI. The positive effect of treatment with P4LA-900 on conception rate was observed when females were inseminated during the warm season. Thus, it is concluded that treatment with P4LA-900 in high producing Holstein females inseminated at fixed time was positive for pregnancy rate at 30, especially during the warm period of the year. Additionally, the hCG treatment increased de P4 concentration, however, no positive effect was verified for the conception rate.

Key words: Progesterone. FTAI. Cow. Holstein. High production

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Modelo hipotético da resposta ao tratamento com P4LA-900, hCG ou a combinação de ambos três dias após a IATF sobre a função luteínica e taxa de concepção em vacas lactantes da raça Holandesa.....	28
Figura 2 -	Delineamento experimental, Experimento 1.....	31
Figura 3 -	Delineamento experimental, Experimento 2.....	32
Figura 4 -	Delineamento experimental, Experimento 3.....	34
Figura 5 -	Perfil plasmático de progesterona (P4) em vacas lactantes da raça Holandesa após o tratamento com diferentes doses de uma fonte exógena de progesterona injetável de longa ação (P4LA).....	36
Figura 6 -	Perfil plasmático de progesterona (P4) de vacas lactantes da raça Holandesa após tratamento com progesterona injetável de longa ação (P4LA-900), gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou a associação de ambos os tratamentos.....	37
Figura 7 -	Perfil plasmático de progesterona (P4) em vacas lactantes da raça Holandesa após tratamento com progesterona injetável de longa ação (P4LA-900).....	37
Figura 8 -	Perfil plasmático de progesterona (P4) em vacas da raça Holandesa após a aplicação de gonadotrofina coriônica humana (hCG).....	38
Figura 9 -	Dinâmica luteínica de vacas da raça Holandesa de alta produção após o tratamento com progesterona injetável de longa ação (P4LA-900), gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou a associação de ambos os tratamentos.....	38
Figura 10 -	Dinâmica luteínica de vacas lactantes da raça Hoalandesa após o tratamento com progesterona injetável de longa ação (P4LA-900).....	39
Figura 11 -	Dinâmica luteínica de vacas lactantes da raça Holandesa após a aplicação de gonadotrofina coriônica humana (hCG).....	40
Figura 12 -	Intervalo médio entre a ovulação sincronizada e o retorno ao estro em vacas lactantes da raça Holandesa submetidas a quatro tratamentos: 1. Controle (ausência de tratamento, n = 13); 2. P4LA-900 (progesterona injetável de longa ação, n = 9); 3. hCG (gonadotrofina coriônica humana; n = 13); e 4. P4LA-900+hCG (progesterona injetável de longa ação e gonadotrofina coriônica humana; n = 12). Dados apresentados como média ± erro padrão da média.....	41
Figura 13 -	Taxa de concepção aos 30 e 60 dias de gestação e perda gestacional de vacas da raça Holandesas tratadas ou não com progesterona injetável de longa ação (P4LA-900mg) três dias após a IATF. Dados apresentados como porcentagem.....	44

Figura 14 -	Taxa de concepção aos 30 e 60 dias de gestação e perda gestacional de vacas da raça Holandesa tratadas ou não com hCG (2.000UI) três dias após a IATF. Dados apresentados como porcentagem.....	44
-------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estatística descritiva relacionada as fazendas integrantes do Experimento 3.....	33
Tabela 2 -	Taxa de concepção (TC) e perda gestacional (PG) aos 30 e 60 dias para vacas lactantes da raça Holandesa conforme o tratamento empregado três dias após a IATF. Dados apresentados como porcentagem.....	43
Tabela 3 -	Taxa de concepção (TC) aos 30 e 60 dias e perda gestacional (PG) conforme fazenda para vacas lactantes da raça Holandesa tratadas com progesterona injetável de longa ação três dias após a IATF. Dados apresentados como porcentagem.....	46
Tabela 4 -	Taxa de concepção aos 30 e 60 dias conforme a época do ano para vacas lactantes da raça Holandesa tratadas com progesterona injetável de longa ação três dias após a IATF.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR EM BOVINOS	18
2.2	CORPO LÚTEO (CL)	20
2.3	PRODUÇÃO DE ESTERÓIDES PELO CORPO LÚTEO	21
2.4	LUTEÓLISE	22
2.5	CAPACIDADE DE REFRATARIDADE INICIAL DO CORPO LÚTEO	24
2.6	A IMPORTÂNCIA DA P4 DURANTE O DIESTRO INICIAL	25
3	HIPÓTESES	27
3.1	<i>EXPERIMENTO 1</i> : Perfil plasmático de progesterona	27
3.2	<i>EXPERIMENTO 2</i> : Dinâmica folicular e função luteínica	27
3.3	<i>EXPERIMENTO 3</i> : Teste de prenhez	27
4	OBJETIVO	29
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5	MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1	EXPERIMENTO 1	30
5.2	EXPERIMENTO 2	31
5.3	EXPERIMENTO 3	32
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
6	RESULTADOS	36
6.1	EXPERIMENTO 1	36
6.2	EXPERIMENTO 2	36
6.3	EXPERIMENTO 3	41
7	DISCUSSÃO	48
7.1	EXPERIMENTO 1	48
7.2	EXPERIMENTO 2	49
7.3	EXPERIMENTO 3	51
8	CONCLUSÃO	55
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o rebanho leiteiro mundial é composto por aproximadamente 251 milhões de cabeças, e o Brasil ocupa posição de destaque neste cenário, apresentando a segunda colocação com aproximadamente 38 milhões de fêmeas destinadas para produção de leite (ANUALPEC 2014). Deste total de animais do rebanho brasileiro, ao redor de 16 milhões de cabeças são fêmeas em idade produtiva (ANUALPEC 2014). No entanto, quando se compara a produtividade brasileira com a dos principais países produtores de leite, observa-se valores muito aquém do potencial da nação. Segundo dados de 2013, a produção média por dia por vaca é de aproximadamente 5,7 L com lactação de 270 dias de duração (ANUALPEC 2014). Dessa forma, diante do volume de animais existentes no Brasil, verifica-se a extensa capacidade de crescimento em produção e produtividade de leite bovino no país.

Nesse contexto, as biotecnologias da reprodução podem ser consideradas como estratégias de impacto, visto que possibilitam aumentos nos índices reprodutivos, aumentam a velocidade do ganho genético, bem como melhoram a produtividade das fazendas. Dentre as biotecnologias podemos citar a inseminação artificial (IA) e a IA em tempo fixo (IATF); bem com os programas de transferência de embriões tanto os produzidos *in vivo* de doadoras superovuladas (SOV) quanto os produzidos *in vitro* (PIV). Destas tecnologias reprodutivas, a IATF apresenta grande destaque, sendo atualmente a mais utilizada em rebanhos leiteiros (SARTORI, 2007).

Apesar do crescente uso das técnicas de reprodução em rebanhos leiteiros, nos últimos anos, as vacas leiteiras de alta produção têm sido associadas a baixa fertilidade, devido a causas multifatoriais (LUCY, 2001). Dentre os fatores associados pode-se citar a condição corporal (CC) durante o peri-parto (BUTLER & SMITH, 1989; RUAS ET AL., 2002), alterações uterinas (SHELDON et al., 2000), estresse térmico pelo calor (BANDINGA et al., 1993; FERREIRA et al., 2011), alterações metabólicas associadas a alta produção de leite (LOPEZ et al., 2005) e alta ingestão de matéria seca (WASHBURN et al., 2002) e baixa eficiência de detecção de estro (NEBEL et al., 1997).

Considerando a fertilidade desses animais, a progesterona (P4) é um hormônio esteroide secretado pelo corpo lúteo (CL) e sua adequada concentração circulante é essencial para estabelecimento e manutenção da gestação (WILTBANK et al., 2012). A manipulação farmacológica do perfil deste hormônio em momentos específicos do ciclo reprodutivo pode trazer melhorias na fertilidade das fêmeas. Antes da IA, a suplementação com P4 durante o

desenvolvimento folicular pode aumentar os índices reprodutivos, devido ao seu possível efeito positivo na qualidade oocitária e no ambiente uterino e consequentemente, na qualidade embrionária (BINELLI et al., 2014). Nesse contexto, Bisinotto et al. (2010) relatou maior taxa de concepção (P/IA, 43,0%) em fêmeas que iniciaram o protocolo de IATF (Ovsynch) com maior concentração de P4 endógena comparado aos animais classificados com baixa concentração de P4 (31,3%). Ainda, trabalhos recentes reportaram incremento de 5 a 7 pontos percentuais na taxa de concepção quando fêmeas bovinas receberam um dispositivo intravaginal contendo P4 durante o protocolo Ovsynch (CHEBEL et al., 2010). Portanto, esses trabalhos reforçam a importância de concentrações ideais de P4 durante o desenvolvimento folicular que antecede a ovulação sincronizada.

Da mesma forma, concentrações ideais de P4 também são necessárias após a IA. Diversos estudos têm relatado que baixas concentrações de P4 após a IA são um dos principais motivos do baixo sucesso no estabelecimento e manutenção da gestação em rebanhos leiteiros especializados (MORRIS & DISKIN, 2008). Concentrações ideais de P4 após a IA podem trazer benefícios como, aumento da receptividade uterina, melhor desenvolvimento do concepto (CARTER et al., 2008), maior produção de interferon-tau (MANN & LAMMING, 2008), e consequentemente incremento no sucesso gestacional em bovinos e ovinos (ASHWORTH et al., 1989; STRONG et al., 2005; McNEILL et al., 2006). Portanto, a manipulação da concentração de P4 após a IA pode ser uma alternativa eficiente para melhorar os índices reprodutivos nessas fêmeas.

Vários estudos têm sido realizados visando avaliar as diversas formas de suplementação de P4 após a IA. Segundo Carter et al., 2008 existe uma “janela” ótima para uso de uma fonte exógena de P4 após o estro de forma a favorecer o desenvolvimento embrionário, sendo esta a partir do Dia 3 do ciclo estral. Por outro lado, trabalho realizado com vacas de corte verificou luteólise precoce nas fêmeas tratadas com 300 mg P4 injetável dois dias após ovulação (PUGLIESI, et al., 2014). No entanto, esse comprometimento do desenvolvimento e da funcionalidade do corpo lúteo (CL) parece estar relacionado com o momento e a dose de P4 administrada (VAN CLEEFF et al., 1996). Dessa forma, na tentativa de minimizar esse possível efeito negativo da P4 exógena, pesquisadores iniciaram estudos que associavam a P4 com outro hormônio luteotrófico, como por exemplo, a hCG. Estes nesse sentido, verificaram que animais tratados com P4 e hCG, em um mesmo momento, apresentaram maior concentração de P4, sem comprometer o desenvolvimento do CL (NASCIMENTO et al., 2013). Dessa forma, diferentes estratégias têm sido avaliadas, dentre elas: o uso de fonte exógena de hCG (gonadotrofina coriônica humana), GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) e o uso de dispositivos ou

formulações injetáveis de P4 ou a associação de fontes de P4 e hCG (MARQUES et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2013).

Dessa forma, uso de uma fonte injetável de P4 que proporciona efeito longa ação, poderia proporcionar maior praticidade e facilidade para o manejo de vacas produtoras de leite, já que esta seria de única aplicação após a IATF.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a função luteínica e a taxa de concepção em vacas lactantes da raça Holandesa tratadas com diferentes estratégias para incrementar a concentração de P4 três dias após a IATF dentre elas o uso de uma fonte injetável de P4 de longa ação (P4LA), hCG ou a combinação destas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR EM BOVINOS

Ciclo estral define-se como sendo modificações cíclicas na fisiologia e morfologia dos órgãos reprodutivos da fêmea, assim como no perfil dos hormônios relacionados. A fêmea bovina é poliéstrica anual (MIES FILHO, 1977) e possui ciclo estral com duração média de 21 dias, sendo semelhante entre fêmeas zebuínas e taurinas (VACA et al., 1985; SIROIS; FORTUNE, 1988; BARROS; FIGUEIREDO; PINHEIRO, 1995). Nesse intervalo, o processo contínuo de sequência de eventos fisiológicos e endocrinológicos que envolvem o crescimento e a atresia dos folículos antrais é conhecido por dinâmica folicular (PIERSON; GINTHER, 1984; BORGES et al., 2004).

A teoria das ondas foliculares foi proposta por meio de estudos histológicos de ovários provenientes de abatedouros (RAJAKOSKI, 1960), neste seu autor sugeriu a existência de duas ondas de crescimento de folículos antrais durante o ciclo estral, sendo que em cada uma delas contendo um folículo pré-ovulatório. Em trabalhos seguintes ficou comprovada esta teoria e que cada ciclo possuía de duas a quatro ondas de crescimento folicular (PIERSON; GINTHER, 1988; SAVIO et al., 1988; SIROIS; FORTUNE, 1988). Com o advento da ultrassonografia, foi possível compreender a dinâmica folicular mediante a relação do tempo e os eventos endocrinológicos e morfológicos das estruturas ovarianas no decorrer do ciclo estral (SIROIS; FORTUNE, 1988; GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989a; ADAMS et al., 1992a; 1992b).

O ciclo estral pode ser dividido em duas fases: 1. fase folicular, que se inicia com a regressão do corpo lúteo (CL) e estende-se até a ovulação; 2. fase luteínica, que compreende o período de atividade do CL, período de produção de progesterona (IRELAND; MURPHEE; COULSON, 1980; HAFEZ, 1995). A primeira onda de crescimento folicular, denominada fase de recrutamento, é caracterizada pela presença de folículos antrais (3 a 5 mm) responsivos a gonadotrofinas (GINTHER et al., 2003). Essa etapa está associada à elevação das concentrações plasmáticas do hormônio folículo estimulante (FSH), sendo o crescimento folicular dependente do FSH (ADAMS et al., 1992b).

A divergência folicular acontece ao redor do terceiro dia após o recrutamento, momento em que o folículo dominante (FD) atinge diâmetro folicular de 8,5 mm para fêmeas *Bos taurus*

(GINTHER et al., 1996) e 6,2 mm em *Bos indicus* (GIMENES et al., 2008). A divergência folicular é caracterizada pela contínua taxa de crescimento do FD e decréscimo nas taxas de crescimento dos demais folículos, denominados subordinados (GINTHER et al., 2001). As altas concentrações de estradiol e inibina produzidas pelo FD provocam redução das concentrações plasmáticas de FSH a níveis considerados basais e por mecanismo de “feed back” negativo no eixo hipotalâmico-hipofisário interrompem o crescimento dos folículos subordinados (FSH-dependentes). No entanto, o FD adquire receptores para o hormônio luteinizante (LH) nas células da granulosa e passa a responder com crescimento contínuo (GARVERICK; ZOLLERS; SMITH, 1992).

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) é responsável pela proliferação celular, sensibilização das células do folículo ao FSH e LH e esteroidogênese (SPICER; ALPIZAR; ECHTERNKAMP, 1993; 1995). Dessa forma, considerando-se que o FD possui maior concentração de IGF-I livre, consequentemente maior biodisponibilidade de receptores de FSH, o FD apresenta maior ação das gonadotrofinas para estimulação do crescimento e diferenciação folicular, resultando no estabelecimento da dominância (RIVERA et al., 2001; RIVERA; FORTUNE, 2001).

Com ausência de secreção contínua dos andrógenos produzidos pelo FD ocorre diminuição da produção de estradiol e aumento da secreção de LH, iniciando-se o período de dominância. No entanto, após a divergência, e na presença de altos níveis de progesterona - que promove redução da frequência na pulsatilidade de LH - o folículo dominante torna-se anovulatório. A partir desse momento começa o processo de atresia e perda da dominância, dando início a uma nova onda de crescimento folicular (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989b; ADAMS et al., 1992b). Esse evento pode ocorrer de uma a três vezes em um mesmo ciclo estral (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989a; BARROS; FIGUEIREDO; PINHEIRO, 1995).

O processo de crescimento e de atresia folicular permanece enquanto o CL mantiver a sua função, inclusive durante o período gestacional (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989a; GINTHER et al., 1996; THOMPSON et al., 2011). Quando não há cópula, fecundação ou o reconhecimento materno da gestação, determinado pela produção de interferon-tau pelo conceito, o processo de luteólise acontecerá (THATCHER et al., 2001). A ocorrência deste nessa fase do ciclo determina que o FD presente nesta onda seja o folículo ovulatório (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989a). O folículo ovulatório aumenta a produção e concentração de estrógeno, culminando na ativação do mecanismo de “feed back” positivo para secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), tendo como consequência o pico

de LH que promove a ovulação (STOCK; FORTUNE, 1993). Ao final, uma vez iniciado o processo de ovulação, uma nova onda de crescimento folicular se estabelece.

2.2 CORPO LÚTEO (CL)

O CL participa da maioria dos processos reprodutivos, sendo considerada uma estrutura endócrina transitória, formada a partir do folículo ovulatório e possui como função primordial a produção de P4. A P4 é responsável pela preparação do endométrio e miométrio para implantação, além de ter um papel ímpar na manutenção da gestação inicial. Caso a concepção não ocorra, o CL sofre a regressão, dando início a um novo ciclo estral (WILTBANK, 1994; SAKAMOTO et al., 1995; MILVAE et al., 1996; MILVAE, 2000). O CL se desenvolve a partir das células residuais do folículo pré-ovulatório. Antes da ovulação, o folículo é organizado em distintas camadas. As células da granulosa e o oócito são separados das outras camadas foliculares pela membrana basal, que acima dela encontram-se a teca interna e externa (MILVAE et al., 1996).

Os capilares de vascularização ao redor dos folículos estão presentes na teca interna e externa, mas estão ausentes na camada de células da granulosa porque a membrana basal atua como uma barreira para a vascularização, já o LH, por sua vez, provoca alterações na estrutura parede folicular que resulta no seu rompimento e consequente liberação do oócito, fenômeno caracterizado como ovulação (revisado por BAO & GARVERICK, 1998).

Após a ovulação, ocorre a diferenciação das células foliculares residuais. As células da teca interna, associadas aos capilares atravessam a membrana basal que está rompida (para ovulação) e invadem a camada da granulosa e o tecido folicular remanescente (interiorização e preenchimento do antro, após a expulsão do fluído folicular), levando ao desenvolvimento do CL, que inicia a produção de P4 (NISWENDER et al., 2000).

O CL contém populações de células heterólogas que incluem as grandes células esteroidogênicas luteais (LLC – large lutein cells) – células da granulosa luteinizadas - e as pequenas células esteroidogênicas luteais (SLC – small lutein cells) – células da teca luteinizadas (FIELDS & FIELDS, 1996). A organização dessas células é espécie-dependente. No caso de mamíferos não-primatas ocorre uma “mistura” dos tipos celulares, com migração das mesmas, o que não é visto no caso de primatas (NISWENDER, 2000). Estes dois tipos celulares perfazem aproximadamente 70% do volume do CL (O’SHEA et al., 1989). As SLC

compreendem 26% (em número) das células luteínicas; perfazem aproximadamente 28% do volume do CL, e são conhecidas pela produção de progesterona quando estimuladas pelo LH.

Já as LLCs compreendem apenas 3% (em número) das células luteínicas, mas perfazem aproximadamente 40% do volume (FIELDS & FIELDS, 1996) e não são dependentes do LH para secretar progesterona, embora apresentem receptores para tal (CHEGINI et al., 1991). Essas células são responsáveis pela manutenção dos níveis basais de P4 durante todo o ciclo.

Além do tecido folicular diferenciado, durante a reorganização celular para a formação do CL, há a migração de células endoteliais, fibroblastos (CHANNING, 1969) e constituintes do sistema imunológico como os leucócitos (PATE, 1994), misturando-se com as LLC e SLC.

Um aspecto muito importante do desenvolvimento do CL inicial é a taxa de crescimento tecidual e proliferação celular. Este crescimento é o resultado de um aumento de tamanho de aproximadamente duas vezes das LLC (hipertrofia), aumento do número de SLC, fibroblastos e células endoteliais (FARIN et al., 1986). Este crescimento explosivo das células luteais é semelhante às taxas de desenvolvimento de tumores de rápido crescimento (PARRY et al., 1980).

A proliferação das células endoteliais é um requisito para a neovascularização durante o desenvolvimento luteal, que resulta em uma extensiva rede de capilares sanguíneos (REDMER & REYNOLDS, 1996). A justaposição existente entre as células luteais e os capilares, abastece a alta demanda metabólica do CL, que costuma consumir de duas a seis vezes mais oxigênio por unidade de peso, que outros órgãos, como o fígado, rim e coração (SWANN & BRUCE, 1987). Essa rede também é responsável por carrear os hormônios produzidos pelo referido órgão à circulação.

2.3 PRODUÇÃO DE ESTEROIDES PELO CORPO LÚTEO

Todos os esteroides produzidos pelo organismo têm como precursor básico o colesterol. Para tanto este substrato deve estar presente nas células para transformação bioquímica, bem como os agentes (enzimas) responsáveis pelos processos.

A ovulação é precedida por uma elevação dos níveis plasmáticos de LH (pico pré-ovulatório), que induz a luteinização das células da granulosa (tornando-se LLC) e da teca (tornando-se SLC). Essa alteração além de morfológica é, principalmente, uma alteração funcional, passando a P4 a ser o principal hormônio esteroide produzido por essas células, em

detrimento a produção de estradiol (principal hormônio produzido por essas células antes da luteinização) (NISWENDER et al., 2000).

Essa alteração funcional se dá pelo aumento ou redução da produção (expressão gênica) de algumas enzimas. As enzimas responsáveis pela transformação colesterol em P4 estão aumentadas (ex. complexo citocromo P450_{ssc} e 3β- hidroxisteroide desidrogenase/ Δ^5, Δ^4 isomerase - 3β-HSD), enquanto que enzimas responsáveis pela transformação da P4 em estrógenos ficam reduzidas (ex.: 17 α-hidroxilase citocromo P450 e citocromo P450 aromatase) (BAO & GARVERICK, 1998).

O colesterol é sintetizado, normalmente, pelos hepatócitos e transportado na forma de LDL (lipoproteína de baixa densidade – Low Density Lipoprotein) e HDL (Lipoproteína de alta densidade – High Density Lipoprotein), para os órgãos alvo, como a adrenal (córtex), folículos (para produção de estrógeno) e CL (para produção de progesterona) (KRISANS, 1996).

Essas lipoproteínas no interior das células luteínicas liberarão o colesterol, que será “armazenado” na forma de ésteres. Assim essas 3 vias, são as possíveis rotas de chegada do mesmo até o interior das células (MILVAE et al., 1996; NISWENDER, 2002).

A síntese dos esteroides é dependente do transporte do colesterol para o interior da membrana mitocondrial, este transporte requer um cito esqueleto intacto e a fosforilação da StAR (proteína esteroidogênica regulatória aguda) (NISWENDER, 2002).

Uma vez que o colesterol tenha sido transportado para a matrix mitocondrial, a enzima citocromo P450_{ssc} atua na conversão do colesterol à pregnenolona que é transportada para o retículo endoplasmático liso (REL), onde a 3β-HSD converte a pregnenolona em progesterona. Após a síntese, a progesterona deixa a célula aparentemente por difusão, não havendo evidências que ela possa ser estocada em altas quantidades no interior do tecido luteal (FIELDS & FIELDS, 1996; NISWENDER et al., 2000; NISWENDER, 2002).

2.4 LUTEÓLISE

O CL durante o ciclo estral nos bovinos é uma estrutura dinâmica com um período de vida de aproximadamente de 17-18 dias (OHTANI et al., 1998). Na ausência da prenhez, o CL é submetido à regressão morfológica e funcional (MILVAE et al., 2000). Este processo,

denominado luteólise, é caracterizado pela cessação da produção de P4 e perda dos componentes celulares, incluindo redução do suprimento vascular, proliferação do tecido conjuntivo, aumento da desorganização celular, degeneração e fagocitose das células luteais (CARLSON et al., 1982; PATE, 1994; MIYAMOTO, 1996).

Evidências para a deterioração morfológica do CL são observadas mais precocemente no dia 14 do ciclo estral em novilhas e no dia 20 em vacas. Vacas leiteiras parecem apresentar o processo de regressão luteal mais tardiamente que vacas de corte, podendo ser explicado por um maior e mais ativo CL, o que provoca um maior intervalo interovulatório (FIELDS & FIELDS, 1996).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ endógena é um hormônio derivado do ácido araquidônico e sintetizado principalmente pelas células epiteliais do endométrio (SPINOSA et al., 1997). Sua função principal na reprodução é provocar a regressão do CL, através do processo de luteólise (TSAI & WILTBANK, 1997). Portanto, pode-se dizer que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ é responsável pelo tempo de vida do CL (SPINOSA et al., 1997) causando sua regressão morfológica e funcional (KOTWICA et al., 2002), sendo que o início da regressão funcional precede a regressão morfológica (VIANA et al., 1999). É vastamente conhecido que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ liberada no útero é proveniente da ativação da ocitocina luteal via fosfolipase C (PLC) (BURNS et al., 1997).

Outros pesquisadores acreditam que as gonadotrofinas (LH) participam ativamente no desencadeamento da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo útero. Isto porque receptores para gonadotrofinas têm sido encontrados por toda a extensão do trato reprodutivo, como no endométrio, sendo as maiores concentrações destes receptores encontrados durante a fase luteal (SHEMESH, 2001). Desta maneira, o LH (não relacionado ao pico pré-ovulatório) alcança esses receptores, induzindo um aumento da produção de cAMP e inositol fosfato. Esta elevação da concentração do cAMP, desencadeia o aumento das concentrações de cicloxigenase endometrial (COX-2) e seu metabólito ($\text{PGF}_{2\alpha}$). Além destas informações, STIPIEN et al. (1999) comentam que há uma relação temporal entre o aumento das concentrações de receptores de LH, indução da COX-2 e produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ nas células endometriais em suínos.

Em ruminantes domésticos, somente uma pequena quantidade da $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina alcança o ovário, por difusão da veia uterina para a artéria ovariana (mecanismo denominado de contra corrente), com mais de 95% da $\text{PGF}_{2\alpha}$ sendo metabolizada a componentes inativados como a 15-ceto-13, 14-diidroprostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$, por uma única passagem pelos pulmões (FERREIRA & VANE, 1967).

Ao alcançar o CL, o efeito luteolítico da $\text{PGF}_{2\alpha}$ resultará na associação com os receptores presentes na membrana plasmática das LLCs, iniciando a cascata de rotas intracelulares que resultam na luteólise e conseqüentemente levando a inibição da síntese de progesterona (ANDERSON et al., 2001). Um pulso inicial de prostaglandina, mesmo sendo de baixa magnitude, pode potencialmente iniciar os mecanismos para que as grandes células luteínicas produzam consideráveis concentrações locais de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (TSAI & WILTBANK, 1997). Isto pode explicar porque uma pequena quantidade de $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina é capaz de iniciar a regressão luteal.

Assim, dois mecanismos podem existir para a amplificação dos pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Em primeiro, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina pode estimular a liberação de ocitocina pelo CL, a qual estimula a produção de mais $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina dentro de minutos de iniciação do pulso (BAIRD, 1992). Em adição, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina pode estimular a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ intraluteal (TSAI & WILTBANK, 1997).

O decréscimo da concentração de P4 é mais comumente devido à diminuição da capacidade esteroidogênica das grandes células luteais (LLC) individuais e do fluxo sanguíneo luteal (MILVAE et al., 1996). Entretanto, apesar da intensa investigação sobre o real mecanismo pelo qual a $\text{PGF}_{2\alpha}$ causa regressão luteal, este ainda permanece indeterminado (MILVAE, 2000).

2.5 CAPACIDADE DE REFRATARIDADE INICIAL DO CORPO LÚTEO

A luteólise é um pré-requisito para que ocorra a maturação final do folículo pré-ovulatório. Em estágios iniciais do desenvolvimento luteal, o CL não é responsivo a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e seus análogos, respectivamente após 5 ou 7 dias (TSAI & WILTBANK, 1997; MOMONT, 1992).

Essa não responsividade se dá não pela ausência de receptores, pois esses estão presentes durante todas as fases do ciclo nas L.L.C. (SAKAMOTO et al, 1995; WILTBANK et al., 1995; TSAI & WILTBANK, 1998). Mas sim por uma baixa afinidade inicial dos receptores, que aumenta com a maturação do mesmo, em até mais de 200 vezes após o 13º ao 20º dia do ciclo estral (COLAZO et al., 2002).

Portanto, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ não irá induzir a luteólise nos primeiros cinco dias do ciclo estral, quando o CL está em fase inicial de desenvolvimento (THATCHER & CHENAULT, 1976), embora apresentem mRNA dos receptores para tal. Em adição, a inabilidade de resposta nesta fase também parece ser devido a uma carência de expressão de outros mediadores que levam a esta luteólise (TSAI & WILTBANK, 1998; LEVY et al., 2000).

PATE (1994) também comenta que esta refratariedade até o dia cinco do ciclo estral pode não ser atribuída a uma carência de receptores a $\text{PGF}_{2\alpha}$, e sim pelo fato da $\text{PGF}_{2\alpha}$ não alcançar o CL inicial do ciclo estral porque o fluxo sanguíneo, nesta fase, é desviado em direção ao útero e para fora do ovário, em bovinos.

Portanto, a carência de responsividade do CL inicial não é atribuída a uma deficiência de receptores de alta afinidade à $\text{PGF}_{2\alpha}$ (WILTBANK et al., 1995) e uma possível explicação para a ausência da regressão de CLs iniciais após a injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ seria a incompleta vascularização do CL ou incompleta diferenciação dos mecanismos degenerativos nas células luteais. Pode-se sugerir que o tipo de célula que medeia às ações luteolíticas da $\text{PGF}_{2\alpha}$, possivelmente o endotélio, pode ser não responsivo durante a fase luteal inicial (LEVY et al., 2000). Concordando com tais afirmações, MEIDAN & LEVY (2002) comentam em sua revisão que a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 4 do ciclo estral não é capaz de provocar a luteólise, pois o CL inicial apresenta falha em aumentar a expressão do gene da ET-1 e seus receptores. Em contraste, ambos os genes são induzidos em CLs maduros, quando expostos à $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Adicionalmente, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida pelas células luteais é de grande importância para a completa luteólise. Esta é uma das suposições sobre o CL inicial não ser capaz de sofrer luteólise: ele não é capaz de expressar a COX-2 (prostaglandina G/H Sintetase-2) que sintetiza a prostaglandina nas grandes células luteínicas (TSAI & WILTBANK, 1997; TSAI & WILTBANK, 1998).

2.6 A IMPORTÂNCIA DA P4 DURANTE O DIESTRO INICIAL

A janela de pré-implantação gestacional em fêmeas bovinas é considerada um momento crucial para determinar o sucesso ou não de uma gestação (SARTORI et al., 2002; DISKIN et al., 2012) e neste período o conceito está sob influência do endométrio uterino para o seu desenvolvimento (BAZER et al., 2011). Toda esta regulação endometrial como transcrição,

secreção e composição do histotrofo são altamente influenciados pela concentração de P4 durante o momento de pré-implantação (FORDE et al., 2009). Porém visto que vacas de leite com alta ingestão de matéria seca é determinado pelo metabolismo hepático que sofre este hormônio e como já mencionado anteriormente animais deste padrão apresentam baixas concentrações circulantes deste esteroide sendo altamente prejudicial nesta “janela crítica” de implantação do concepto (DEMETRIO et al., 2007) e a partir destes dados iniciou uma busca de possíveis estratégias para suplementação de P4 após a ovulação a fim de melhorar a P/IA.

Contudo a resposta proveniente de um aumento na concentração de P4 adicional seja esta, através da ovulação de um folículo de primeira onda para gerar um corpo lúteo acessório ou devido à introdução de uma fonte exógena de P4 após a IA, dependerá do momento na qual esta é feita após a ovulação, uma vez que afetará o ambiente uterino, porém pode ser inadequado para melhoria da taxa de prenhez (BINELLI, et al 2014). Exemplificando este fato, estudos suplementando com implante de P4 vacas de leite no período inicial de diestro demonstraram uma melhora na P/IA, foi o caso de MONTEIRO JR. et al (2014) que trabalhando com dispositivos intravaginais de P4 (uma única aplicação entre os dias 4 a 17 após a IA ou inserindo um segundo dispositivo no dia 7) em animais inseminados por detecção de estro ou por IATF observou efeito positivo P/IA desta suplementação somente para os animais que foram inseminados em tempo fixo tratados com um único dispositivo inserido entre os dias 4 a 17 (MONTEIRO JR. et al., 2014). Todavia ainda não está clara se esta fonte exógena de P4 após a IA poderia prejudicar a formação e função do CL original, este fato não foi reportado em estudos realizados em vacas de leite e de corte que receberam uma fonte exógena de P4 (SOUZA et al., 2013; MONTEIRO JR et al., 2013; PUGLIESI et al., 2014).

Entretanto alguns autores observaram um efeito negativo desta suplementação exógena de P4, PUGLIESI et al. (2014) trabalhando com 300 mg de P4LA 2 dias após a ovulação em vacas de corte observou uma antecipação da luteólise em 4 dias para os animais tratados em relação ao grupo controle. O mesmo foi notado por O'HARA et al. (2013) que verificou em seu estudo que animais suplementados com um dispositivo de P4 (a partir do dia 3 a 5 ou até 7 após o estro) podem apresentar uma luteólise precoce, no entanto esta mesma suplementação é benéfica para a composição do histotrofo estimulando o concepto.

Uma possível ferramenta para minimizar efeito negativo da suplementação exógena de P4 seria a utilização de uma fonte de hCG de maneira isolada ou concomitante a outra estratégia, independente da maneira que é utilizado o hCG quando aplicado no diestro inicial pode incrementar a área do CL original estimulando a produção e a concentração de P4 (SOUZA, et al., 2013; MAILLO et al., 2013).

3 HIPÓTESES

3.1 *EXPERIMENTO 1*: Perfil plasmático de progesterona

- O perfil plasmático de progesterona após aplicação de P4LA é dose-dependente em fêmeas da raça Holandesa de alta produção;

3.2 *EXPERIMENTO 2*: Dinâmica folicular e função luteínica

- A administração de P4LA três dias após a IATF aumenta a concentração circulante de P4, porém interfere na formação e na funcionalidade do corpo lúteo em vacas da raça Holandesa em lactação (Figura 1).
- A administração de uma fonte de hCG (Gonadotrofina coriônica humana) três dias após a IATF promoverá incremento no volume do corpo lúteo e consequentemente aumento da concentração de progesterona circulante (Figura 1).
- A administração de hCG em vacas tratadas com P4LA aumenta a concentração circulante de P4, melhora o desenvolvimento do CL e minimiza possíveis efeitos negativos do tratamento com P4LA na formação e funcionalidade do CL (Figura 1).

3.3 *EXPERIMENTO 3*: Teste de concepção

- A administração de P4LA três dias após a IATF não aumenta a taxa de concepção em vacas da raça Holandesa de alta produção (Figura 1).
- A administração de hCG três dias após a IATF aumenta a taxa de concepção em vacas da raça Holandesa de alta produção (Figura 1).
- O tratamento com P4LA associado ao hCG três dias após a IATF aumenta a taxa de concepção em vacas da raça Holandesa de alta produção (Figura 1).

Figura 1. Modelo hipotético da resposta ao tratamento com P4LA-900, hCG ou a combinação de ambos três dias após a IATF sobre a função luteínica e taxa de concepção em vacas lactantes da raça Holandesa.

4 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da administração de P4LA, de hCG e o uso concomitante de ambos tratamentos três dias após a IATF sobre a função luteínica e a taxa de concepção de vacas holandesas de alta produção.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

As seguintes variáveis foram analisadas:

- Concentração plasmática de P4 após o tratamento com diferentes doses de P4LA;
- Volume do CL e concentração plasmática de P4 após a aplicação dos tratamentos;
- Taxa de concepção aos 30 e 60 dias após a IATF;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 EXPERIMENTO 1

O estudo foi conduzido em uma fazenda comercial localizada em Cravinhos (21° 10' 25" S / 47° 43' 46" W), Estado de São Paulo, Brasil durante o mês de fevereiro de 2012. Avaliou-se o perfil plasmático de progesterona (P4) após administração de diferentes doses de progesterona injetável (P4LA; Sincrogest Injetável, Ourofino Saúde Animal Ltda, Brasil) em vacas de alta produção de leite. Após sincronização da ovulação, 29 vacas em lactação (produção de $30,9 \pm 6,8$ kg/dia, $41,0 \pm 12,3$ dias em lactação, $1,4 \pm 1,3$ partos e escore de condição corporal de $2,8 \pm 0,5$ - escala de 1 a 5 FERGUSON et al., 1994) foram selecionadas para o estudo. Doze dias após ovulação sincronizada (ovulação identificada por US; D23), as fêmeas receberam um implante auricular de norgestomet (Crestar®, Intervet, Holanda) e 500µg Cloprostenol Sódico (Sincrocio®, Ourofino Saúde Animal Ltda, Brasil).

Amostras de sangue (0, 12 e 24 horas após o implante) foram colhidas para identificar os animais com níveis de progesterona inferior a 1ng/mL e somente estes foram submetidos aos tratamentos 24 horas após o tratamento inicial (D24). Nesse momento, os animais foram alocados de forma equilibrada quanto à produção diária de leite, dias em lactação, número de partos e escore de condição corporal em quatro grupos experimentais: Controle (n=8) os animais não receberam tratamento; P4LA300 (n=7): os animais receberam 300mg de P4 i.m.; P4LA600 (n=7): os animais receberam 600mg de P4 i.m.; e P4LA900 (n=7): os animais receberam 900mg de P4 i.m. Amostras de sangue foram coletadas de forma seriada a cada 24 h até 216 h após o tratamento para determinação da concentração plasmática de P4. (Figura 2)

Figura 2. Delineamento experimental, Experimento 1.

5.2 EXPERIMENTO 2

O estudo foi conduzido em uma fazenda comercial localizada em Cravinhos (21° 10' 25" S / 47° 43' 46" W), Estado de São Paulo, Brasil durante o mês de fevereiro de 2012. Avaliou-se o efeito da administração de uma progesterona injetável (P4LA; Sincrogest® injetável, Ourofino, Brasil) e/ou a administração de uma gonadotrofina coriônica humana (hCG; Chorulon, MSD, Holanda) sobre a função e dinâmica luteínica de vacas da raça Holandesa.

Após tratamento para sincronização da ovulação de 83 animais em dia aleatório do ciclo estral (Dia -10), 75 fêmeas da raça Holandesa (produção de $32,5 \pm 0,6$ kg/dia, $95,8 \pm 4$ dias em lactação, $1,5 \pm 1,0$ partos e escore de condição corporal de $2,9 \pm 0,6$ – escala de 1 a 5 FERGUSON et al., 1994) foram selecionadas após identificação da ovulação no Dia 3. Estes animais foram alocados de forma equilibrada quanto à produção diária de leite, dias em lactação, número de partos, escore de condição corporal e diâmetro do folículo no momento da ovulação, em quatro grupos experimentais: Controle (n=20) os animais não receberam tratamento; P4LA-900 (n=18) os animais receberam 900mg de P4 i.m.; hCG (n=19) os animais receberam 2000UI de hCG i.m.; P4LA-900+hCG (n=18) os animais receberam 900mg de P4 e 2000UI de hCG i.m.

Amostras de sangue foram coletadas nos Dias 3, 5, 9, 13 e 17 para avaliar a concentração (ng/mL) plasmática de P4. Exames ultrassonográficos foram realizados nos Dias 5, 9 e 13 para mensurar o volume (mm²) do corpo lúteo (CL). Todos os animais foram avaliados quanto o retorno ao cio após os tratamentos citados entre os Dias 17 e 30, esta avaliação foi realizada através do uso do Estrotec® posicionados na região caudal de cada animal (Figura 3).

Figura 3. Delineamento experimental, Experimento 2.

5.3 EXPERIMENTO 3

O estudo todo foi realizado em duas propriedades comerciais fazenda A localizada em Araras (22° 21' 25" S / 47° 23' 03" W) e fazenda B localizada em Águas da Prata (21° 56' 12" S / 46° 43' 00" W), ambas no Estado de São Paulo, Brasil. Em ambas fazendas (Tabela 1), o estudo foi realizado entre 2013 (março e abril) e 2014 (fevereiro, março, abril, maio, junho). Avaliou-se o efeito de diferentes tratamentos com uma formulação injetável de P4 bem como sua interação ou não com uma fonte de hCG após um protocolo de IATF sobre a taxa de concepção de vacas Holandesas de alta produção.

Foram utilizadas 982 vacas holandesas de alta produção (produção de 30,8±10,4 kg/dia, 145,7±106,9 dias em lactação, 2,0±1,1 número de lactações, 3,1±2,4 serviços e escore de condição corporal de 2,9±0,3 – escala de 1 a 5; FERGUSON et al., 1994). Em dia aleatório do

ciclo estral (Dia -10) os animais receberam tratamento para sincronização do ciclo estral para IATF (Dia 0). Três dias após a IATF (Dia 3) os animais foram homogeneamente divididos quanto à produção diária de leite, dias em lactação, número de partos, escore de condição corporal e alocada em um dos quatro grupos experimentais (Figura 4): Controle (n=250) estes animais não receberam qualquer tipo de tratamento pós IATF; P4LA-900 (n=245) os animais receberam tratamento de 900 mg de P4 i.m. três dias pós IATF; hCG (n=237) os animais receberam tratamento de 2000 UI i.m. de hCG três dias pós IATF; P4LA-900+hCG (n=250) os animais destes grupo receberam o tratamento de 900 mg de P4 e 2000 UI de hCG i.m.

A presença de corpo lúteo após a sincronização da ovulação foi avaliada com o auxílio do ultrassom (Modelo DP2200VET – Myndral - China) sete dias após a IATF (Dia 7). Ainda por ultrassonografia, o diagnóstico gestacional foi realizado aos 30 dias após a IATF e confirmado aos 60 dias posterior ao mesmo procedimento. A prenhez foi caracterizada pela presença de uma vesícula embrionária com um embrião viável (presença de batimentos cardíacos) e a confirmação da prenhez foi caracterizada pela presença de uma assimetria entre os cornos uterinos, detecção da vesícula amniótica e palpação do alanto-cório.

Tabela 1. Estatística descritiva relacionada às fazendas integrantes do Experimento 3.

	FAZENDA A	FAZENDA B	GERAL
n	255	725	980
Número de lactações (min – max) (Primípara/Plurípara)	1,9 ± 1,2 (1 – 7) (124/131)	2,0 ± 1,0 (1 – 7) (303/422)	2,0 ± 1,1 (1 – 7) (427/553)
Número de serviços (min – max)	2,6 ± 1,9 (1 – 10)	3,3 ± 2,5 (1 – 17)	3,1 ± 2,4 (1 – 17)
Dias em lactação (min – max)	137,1 ± 79,9 (59 – 494)	148,8 ± 114,8 (37 – 700)	145,7 ± 106,9 (37 – 700)
Produção de leite diária, L (min – max)	40,9 ± 10,6 (7,3 – 67,0)	27,4 ± 7,8 (6,0 – 52,0)	30,8 ± 10,4 (6,0 – 67,0)
Número de touros (Número de inseminações por touro)	3 (80/96/79)	4 (158/209/205/153)	6
Número de inseminadores (número de inseminações por inseminador)	2 (153/102)	2 (311/414)	4
Número de usos do implante de progesterona (novo/usado previamente por oito dias)	(156/99)	(375/350)	(531/449)
Época do ano (quente/não quente)	(74/181)	(292/433)	(366/614)
Taxa de prenhez aos 30 dias, %	18,4	34,8	30,5

Figura 4. Delineamento experimental, Experimento 3.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS® (SAS, 2000). No experimento 1, o modelo estatístico foi formado pelo efeito de P4 e tempo e a interação. No experimento 2, o modelo estatístico foi formado pelo efeito de P4, hCG e tempo e a interações. As variáveis contínuas (concentração de P4, volume do CL e intervalo ovulação-deteção do estro) foram submetidas à análise de diferentes distribuições de dados e foi utilizada para verificar diferença entre os tratamentos, a análise que apresentassem o menor Akaike's An Information Criterion (AIC). Após essa avaliação, os dados foram submetidos à análise de medidas repetidas no tempo usando o procedimento GLIMMIX do SAS®, exceto para variável intervalo ovulação-deteção do estro.

Para análise da taxa de concepção (variável resposta binomial) as variáveis independentes incluídas no modelo inicial foram P4LA, hCG, fazenda (A e B), época do ano (quente: fevereiro e março e não quente: abril a junho), número de lactações (primípara e plurípara), número de inseminações (até duas e três ou mais) e dias em lactação (até 78 dias, entre 79 e 155 e acima de 155 dias) e suas interações. Foram considerados efeitos aleatórios, touro dentro de lote e usos do implante dentro de lote. Foi utilizado o modelo “backward stepwise regression”, e as variáveis explanatórias foram sequencialmente removidas do modelo estatístico seguindo o critério de Wald se $P > 0,20$.

No modelo final para análise da taxa de concepção aos 30 dias foram mantidos os efeitos LAP4, hCG, interação LAP4 e hCG, fazenda, época do ano e interação época do ano e LAP4. Para análise aos 60 dias foram mantidos os efeitos P4LA, hCG, interação P4LA e hCG, fazenda,

interação fazenda e P4LA, época do ano, interação época do ano e P4LA, número de lactações e dias em lactação. Por fim, para análise da perda gestacional entre 30 e 60 dias de gestação foram mantidos no modelo final efeitos de P4LA, hCG, interação P4LA e hCG, número de lactações e interação hCG e número de inseminações.

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão médio ou em porcentagem. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos e valores entre 0,05 e 0,10 foram considerados tendência.

6 RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO 1

Verificou-se interação entre tratamento e tempo ($P=0,002$; Figura 5). Os grupos P4LA300 e P4LA600 apresentaram valores superiores ao grupo controle somente nas coletas realizadas 24 e 48 h após a administração do tratamento, respectivamente. Já o grupo P4LA900 apresentou valores estatisticamente superiores ao controle nos momentos 24 a 216 h após o tratamento.

Figura 5. Perfil plasmático de progesterona (P4) em vacas lactantes da raça Holandesa após o tratamento com diferentes doses de uma fonte exógena de progesterona injetável de longa ação (P4LA).

FONTA (SOUZA, 2015.)

6.2 EXPERIMENTO 2

Não foi observado efeito de P4LA-900 ($P=0,22$), hCG ($P=0,70$) e interação P4LA-900 e hCG ($P=0,49$) na concentração plasmática de P4, no entanto, verificou-se efeito de tempo ($P=0,0001$; Figura 6). Ainda, observou-se interação entre o tratamento P4LA-900 e tempo ($P=0,0001$; Figura 7) e tratamento hCG e tempo ($P=0,05$; Figura 8) para a concentração de P4 plasmática. Os animais tratados com P4LA-900 apresentaram maior concentração de P4 nos

Dias 5 e 9. Enquanto que animais tratados com hCG apresentaram maior concentração de P4 no Dia 9. Não foi verificado interação tratamento P4LA-900, tratamento hCG e tempo ($P=0,77$) para concentração plasmática de P4.

Figura 6. Perfil plasmático de progesterona (P4) de vacas lactantes da raça Holandesa após tratamento com progesterona injetável de longa ação (P4LA-900), gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou a associação de ambos os tratamentos.

FONTE (SOUZA, 2015.)

Figura 7. Perfil plasmático de progesterona (P4) em vacas lactantes da raça Holandesa após tratamento com progesterona injetável de longa ação (P4LA-900).

6,77

FONTE (SOUZA, 2015)

Figura 8. Perfil plasmático de progesterona (P4) em vacas da raça Holandesa após a aplicação de gonadotrofina coriônica humana (hCG).

FONTE (SOUZA, 2015.)

Para o volume do CL não foi observado efeito de P4LA-900 ($P=0,45$), interação P4LA-900 e hCG ($p=0,83$), interação P4LA-900 e tempo ($P=0,27$) e interação P4LA-900, hCG e tempo ($P=0,89$). No entanto, houve efeito de tempo ($P=0,0001$; Figura 9). Ainda, verificou-se efeito do tratamento com hCG ($P=0,005$) e interação hCG e tempo ($P=0,002$; Figura 9 e 10) para volume do CL. Observou-se que animais tratados com hCG (P4LA-900+hCG e hCG) apresentaram maior volume do CL nos Dias 9 e 13 em relação aos grupos não tratados com hCG (controle e P4LA-900).

Figura 9. Dinâmica luteínica de vacas da raça Holandesa de alta produção após o tratamento com progesterona injetável de longa ação (P4LA-900), gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou a associação de ambos os tratamentos.

FONTE (SOUZA, 2015.)

Figura 10. Dinâmica luteínica de vacas lactantes da raça Holandesa após tratamento com progesterona injetável de longa ação (P4LA).

FONTE: (SOUZA, 2015.)

Figura 11. Dinâmica luteínica de vacas lactantes da raça Holandesa após a aplicação de gonadotrofina coriônica humana (hCG).

FONTE (SOUZA, 2015.)

Adicionalmente, não houve diferença na proporção de animais detectados em estro após ovulação conforme o tratamento [Controle: 59,1% (12/21); P4LA-900: 47,4% (9/19); hCG: 65,0% (13/20); e P4LA-900+hCG: 63,2% (12/19); efeito de P4LA, $P = 0,55$; efeito de hCG, $P = 0,33$ e efeito de interação P4LA*hCG, $P = 0,67$]. Ainda, dentre os animais detectados em estro após ovulação, não foi observado diferença sobre o intervalo entre a ovulação após a sincronização e o retorno ao estro para os diferentes tratamentos os grupos tratados com P4LA ($P=0,16$) e a interação entre os tratamentos P4LA*hCG ($P=0,23$). Contudo foi observado efeito para o grupo tratado com hCG ($P=0,05$); Figura 12).

Figura 12. Intervalo médio entre a ovulação sincronizada e o retorno ao estro em vacas lactantes da raça Holandesa submetidas a quatro tratamentos: 1. Controle (ausência de tratamento, n = 13); 2. P4LA-900 (progesterona injetável de longa ação, n = 9); 3. hCG (gonadotrofina coriônica humana; n = 13); e 4. P4LA-900+hCG (progesterona injetável de longa ação e gonadotrofina coriônica humana; n = 12). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

FONTE (SOUZA, 2015.)

6.3 EXPERIMENTO 3

A taxa de concepção, independente do tratamento empregado, foi de 30,5%. No presente estudo verificou-se efeito estatístico na taxa de concepção aos 30 dias para o grupo de animais tratados com P4LA-900 ($P=0,002$; Tabela 2 e Figura 13). Não foi verificado efeito do tratamento com hCG ($P=0,20$; Tabela 2 e Figura 13) ou interação P4LA-900 e hCG ($P=0,71$; Tabela 2) para taxa de concepção aos 30 dias. Ainda, para taxa de concepção aos 60 dias não foi observado efeito de P4LA-900 ($P=0,33$; Tabela 2 e Figura 13), hCG ($P=0,26$; Tabela 2 e Figura 14) e interação P4LA-900 e hCG ($P=0,40$; Tabela 2). Para perda gestacional entre 30 e

60 dias também não foi observado efeito de P4LA-900 ($P=0,67$; Tabela 2 e Figura 13), hCG ($P=0,97$; Tabela 2 e Figura 14) e interação P4LA-900 e hCG ($P=0,57$; Tabela 2).

Tabela 2. Taxa de concepção (TC) e perda gestacional (PG) aos 30 e 60 dias para vacas lactantes da raça Holandesa conforme o tratamento empregado três dias após a IATF. Dados apresentados como porcentagem.

	Tratamento				Valor de P		
	P4LA-900		sem P4LA-900		P4LA-900	hCG	P4LA-900*hCG
	hCG	sem hCG	hCG	sem hCG			
TC 30 dias, %	32,8 (250)	35,9 (245)	24,6 (236)	28,5 (249)	0,002	0,20	0,71
TC 60 dias, %	30,8 (250)	31,8 (245)	23,3 (236)	27,7 (249)	0,33	0,26	0,40
PG, %	6,1 (82)	11,4 (88)	5,2 (58)	2,8 (71)	0,67	0,97	0,57

Figura 13. Taxa de concepção aos 30 e 60 dias de gestação e perda gestacional de vacas da raça Holandesas tratadas ou não com progesterona injetável de longa ação (P4LA-900mg) três dias após a IATF. Dados apresentados como porcentagem.

FONTE (SOUZA, 2015.)

Figura 14. Taxa de concepção aos 30 e 60 dias de gestação e perda gestacional de vacas da raça Holandesa tratadas ou não com hCG (2.000UI) três dias após a IATF. Dados apresentados como porcentagem.

FONTE (SOUZA, 2015.)

Adicionalmente, verificou-se efeito de Fazenda, sendo a taxa de concepção aos 30 ($P=0,001$) e 60 dias ($P=0,006$) superior na Fazenda B (Tabela 3). Ainda, verificou-se interação tratamento P4LA-900 e fazenda ($P=0,09$) para taxa de concepção aos 60 dias. A Fazenda B apresentou aumento na taxa de concepção aos 60 dias nos animais tratados com P4LA-900, no entanto, esse efeito não foi verificado na Fazenda A (Tabela 3). Para perda gestacional não foi observado efeito de Fazenda ($P=0,99$), P4LA-900 ($P=0,67$) ou interação Fazenda e P4LA-900 ($P=0,99$).

Com relação a variável época do ano (estação quente e não quente) observou-se aumento na taxa de concepção aos 30 ($P=0,003$) e aos 60 dias ($P=0,03$; Tabela 4) durante a época não quente. Ainda, foi verificada interação P4LA-900 e época para taxa de concepção para 30 dias ($P=0,04$) e 60 dias de gestação ($P=0,07$; Tabela 4). Animais tratados com a P4LA-900 apresentaram aumento na taxa de concepção apenas durante a época quente do ano. Para a perda gestacional entre 30 e 60 dias não foi observado efeito de P4LA-900 ($P=0,67$), época ($P=0,38$) e interação entre P4LA-900 e época do ano ($P=0,69$).

Tabela 3. Taxa de concepção (TC) aos 30 e 60 dias e perda gestacional (PG) conforme fazenda para vacas lactantes da raça Holandesa tratadas com progesterona injetável de longa ação três dias após a IATF. Dados apresentados como porcentagem.

	Fazenda A		Fazenda B		Valor de P *		
	sem P4LA-900	P4LA-900	sem P4LA-900	P4LA-900	Faz	P4LA-900	Faz*P4LA-900
TC 30 dias, %	18,7 (123)	18,2 (132)	29,3 (362)	40,2 (363)	0,001	0,002	0,21
TC 60 dias, %	18,7 ^{bc} (123)	15,2 ^c (132)	27,9 ^b (362)	37,2 ^a (363)	0,006	0,33	0,09
PG, %	0,0 (23)	16,7 (24)	4,7 (106)	7,5 (146)	0,99	0,67	0,99

* a ≠ b na mesma linha com $P \leq 0,05$.

Tabela 4. Taxa de concepção aos 30 e 60 dias conforme a época do ano para vacas lactantes da raça Holandesa tratadas com progesterona injetável de longa ação três dias após a IATF.

	Época quente		Época não quente		Valor de P *	
	sem P4LA-900	P4LA-900	sem P4LA-900	P4LA-900	Época	Época*P4LA-900
TC 30 dias, %	16,3 ^b (184)	30,2 ^a (182)	32,9 ^a (301)	36,7 ^a (313)	0,003	0,002
						0,04
TC 60 dias, %	15,2 ^{by} (184)	26,9 ^{ax} (182)	31,9 ^a (301)	33,9 ^a (313)	0,03	0,33
						0,07
PG, %	6,7 (30)	10,9 (55)	3,0 (99)	7,8 (115)	0,38	0,67
						0,69

* a ≠ b na mesma linha com $P \leq 0,05$ e $x \neq y$ na mesma linha com $P \leq 0,10$.

7 DISCUSSÃO

7.1 EXPERIMENTO 1

A aplicação de diferentes doses de P4LA resultou em diferentes perfis plasmáticos de P4 em vacas da raça Holandesa de alta produção. Foi verificada interação entre o tratamento e tempo, uma vez que a concentração máxima obtida e o tempo de duração do tratamento (concentrações plasmáticas acima de 1ng/ml) foram dependentes das doses administradas (300 mg; 600 mg ou 900 mg de P4LA). O tratamento com 900 mg de P4LA determinou maiores concentrações plasmáticas circulantes de P4 com maior duração. Esses dados estão de acordo com os dados reportados por PUGLIESI et al. (2014), os quais verificaram que quanto maior a dose de P4LA administrada em vacas de corte, maiores concentrações plasmáticas de P4 foram observadas, bem como maior a duração do tratamento. Ainda, superiores concentrações plasmática de P4 também foram observadas em vacas de leite de alta produção tratadas com dois dispositivos intravaginais de P4 comparado com um único dispositivo (MONTEIRO JR. al., 2014; MANN et al., 2006). Cerri et al. (2009) reportaram que a utilização de dispositivos de P4 novos determinaram concentrações plasmáticas de P4 mais elevados quando comparado aos dispositivos utilizados previamente por sete dias. WERVER et al (2013) verificaram que logo após a inserção (24h) de diferentes dispositivos intravaginais de P4 os níveis plasmáticos circulantes do referido hormônio aumentaram significativamente (WERVER et al., 2013), sendo a concentração máxima de P4 dependente da dose administrada. Dessa forma, a concentração plasmática de P4 é dependente da dose da fonte exógena administrada, independente da via de administração (intramuscular ou transvaginal).

Diante das informações obtidas no presente estudo, destaca-se que a dose de 900 mg de P4LA foi a dose que determinou a mais elevada e duradoura concentração plasmática de P4 em relação as outras doses avaliadas. Desta forma, a referida dose foi escolhida para uso nos experimentos subsequentes. Esta escolha foi determinada com o intuito de elevar ao máximo a concentração circulante de P4, considerando o elevado catabolismo hepático para hormônios esteroides, normalmente observados em fêmeas de alta produção leiteira (SANGSRITAVANG et al. 2002).

7.2 EXPERIMENTO 2

As hipóteses de que a administração de P4LA-900 três dias após a IATF em vacas de leite de alta produção eleva a concentração de P4 circulante, porém prejudica a formação e a funcionalidade do CL foi rejeitada. Verificou-se aumento da concentração circulante de P4 após o tratamento, porém o volume do CL e as concentrações de P4 ao final do ciclo estral (Dia 17) não foram alteradas pelo tratamento P4LA. Ainda, a hipótese de que a administração de hCG provoca aumento no volume do CL e da concentração de P4 foram confirmadas. No entanto, o tratamento com P4LA associado ao hCG não melhorou o desenvolvimento do CL, o que poderia minimizar possíveis efeitos negativos do tratamento com P4 na formação do CL.

Assim como observado no presente estudo, Pugliesi et al. (2014) reportaram que a administração de P4LA vacas de corte não lactentes em diferentes concentrações (150 ou 300 mg) e momentos de aplicação (2 ou 3 dias após a ovulação) apresentaram efeito significativo do dia 2 ao 8,5 após a ovulação em vacas Nelore não lactantes, em relação ao grupo controle. Efeitos similares foram relatados em novilhas taurinas de corte (O'HARA et al., 2013), novilhas da raça Holandesa (CARTER et al., 2009) e vacas da raça Holandesa (MONTEIRO JR. et al., 2014; MANN et al., 2006) submetidas ao tratamento com dispositivos intravaginais de P4 em diferentes momentos do diestro. Nestes estudos, independentemente do momento do tratamento, houve aumento nas concentrações circulantes de P4 em comparação ao grupo controle não tratado. Ainda, Nascimento et al. (2013) avaliaram o uso diferentes estratégias (dispositivo intravaginal, hCG ou associação de ambos) para incremento das concentrações circulantes de P4 cinco dias após a IA em vacas e novilhas da raça Holandesa previamente sincronizadas com duplo Ovsynch. Os referidos autores demonstraram que os animais tratados apresentaram aumento significativo nas concentrações plasmáticas de P4 em relação ao grupo controle, independentemente do tipo da estratégia utilizada. Esta última informação corrobora com aquelas encontradas no presente estudo que demonstram que independente do tratamento empregado (P4LA-900; hCG e P4LA-900+hCG), observa-se aumento nas concentrações circulantes de P4 em relação ao grupo controle.

O desenvolvimento do CL não foi alterado após o tratamento com P4LA-900. De forma semelhante, Carter et al. (2008) não observaram interferência da administração de fonte de P4 exógena a partir do Dia 3 do ciclo estral de novilhas de corte sobre o desenvolvimento do CL. Contrariamente, a utilização de dispositivos intravaginais com P4 (Dia 3 aos 7) em novilhas

taurinas de corte resultou na redução do peso do tecido luteal em relação ao grupo controle negativo (O'HARA et al 2013).

Recentemente, Monteiro Jr. et al. (2014) demonstraram que vacas de leite de alta produção tratadas com dois dispositivos intravaginais de P4 inseridos no Dia 4 e no Dia 7 após o estro tendem em apresentar luteólise precoce em relação as fêmeas não tratadas ou aquelas que receberam somente um dispositivo no Dia 4 após o cio (MONTEIRO JR. et al., 2014). Vacas da raça Nelore tratados com 300 mg de P4LA no Dia 2 do ciclo estral apresentaram luteólise precoce (antes do dia 15 do ciclo estral) em relação ao grupo controle não tratado (57,1% vs 0,0%; PUGLIESI et al., 2014). O mesmo foi observado em estudo realizado por Garret et al. (1988), os quais reportaram luteólise precoce (antecipação do estro subsequente em 5 dias em média) em vacas de corte taurinas tratadas com 100 mg de P4 nos quatro primeiros dias após detecção de estro. Diferentemente, durante o desenvolvimento do presente trabalho (P4 administrada 3 dias após IATF) não foram observadas diferenças significativas entre o momento da ovulação sincronizada e o retorno ao estro para os diferentes tratamentos. Esse achado, provavelmente é devido ao momento em que a administração da P4 exógena foi realizada. Desta forma, o impacto negativo da suplementação com P4 durante o início do diestro sobre a duração do ciclo subsequente pode ser dependente do momento do ciclo estral, bem como a dose de P4 administrada.

Segundo Carter et al., 2008 existe um intervalo de tempo para uso de fonte exógena de P4 após o estro que promove melhores resultados. Estes referidos autores sugerem que o tratamento realizado a partir do Dia 3 do ciclo estral favorece a sobrevivência embrionária. Neste mesmo estudo, o tratamento com P4 exógena determinou maior desenvolvimento do concepto (comprimento e área), quando recuperados e avaliados no Dia 14 do ciclo estral. Além disso, conceptos de maior tamanho oriundos de vacas tratadas com P4 no Dia 3 produziram maiores quantidades de IFN-Tau em relação aos conceptos oriundos das fêmeas tratadas no Dia 5, bem como aquelas do grupo controle. Portanto, acredita-se que a administração da fonte injetável de P4LA três dias após a IATF não traz alterações na formação e função do corpo lúteo e apresenta efeitos positivos no desenvolvimento do concepto.

Ainda, o tratamento com hCG provocou aumento no volume (mm^3) do CL e da concentração plasmática de P4 em relação aos grupos não tratados com hCG. Tal resultado corrobora com os dados observados por Marques et al. 2012 em novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus* receptoras de embriões tratadas com 1.500 UI de hCG sete dias após o estro. Vale ressaltar que o aumento da concentração plasmática de P4 nos animais que receberam hCG ocorreu somente seis dias após o tratamento, enquanto que nos animais que receberam P4LA

esse aumento foi verificado dois dias após o tratamento. Esse aumento antecipado da concentração plasmática de P4 pode ser determinante para maior receptividade uterina e sucesso gestacional (CARTER et al., 2008).

7.3 EXPERIMENTO 3

A hipótese de que vacas Holandesas de alta produção tratadas com P4LA-900 três dias após a IATF não aumentam a taxa de concepção devido ao possível comprometimento da funcionalidade do CL não foi comprovada. A administração de hCG, ou sua associação no tratamento com P4LA não aumentou a taxa de concepção, rejeitando as hipóteses do estudo.

Diferentes estudos demonstraram que a manipulação da P4 após a IA induz alterações na expressão gênica e perfil proteico do tecido endometrial, portanto, a suplementação com uma fonte exógena de P4 durante o início da fase luteínica pode ser uma ferramenta interessante para o desenvolvimento embrionário inicial e reconhecimento materno (FORDE et al., 2009, 2011, 2012).

Nesse sentido, estudos prévios verificaram efeitos positivos dos tratamentos com P4 exógena na taxa de concepção. Monteiro Jr. et al. 2014. manipularam as concentrações circulantes de P4 de vacas leiteiras com a inserção de um ou dois dispositivos de P4 em momentos distintos após IATF (grupos Dia 4 e Dia 4 + 7). Tais dispositivos foram mantidos até o dia 18 depois da IATF. Estes referidos autores verificaram que os animais tratados com um único implante quatro dias depois de inseminados em tempo fixo apresentaram maior taxa de prenhez em relação aos grupos controle e tratados com dois dispositivos intravaginais [controle = 31,3 (72/240) x D4 = 39,2 (89/237) x D4+7 = 27,5 (68/241)] para o diagnóstico aos 60 dias (MONTEIRO JR. et al., 2014). Em outro estudo, utilizando 100 mg de P4 nos dias 2, 3, 4, 6 e 9 após a inseminação, verificou-se melhora na taxa de concepção para os animais tratados em relação aos animais do grupo controle [68% (36/53) vs 42% (29/69); JOHNSON et al., 1958). Outros autores avaliando os benefícios da inserção de dispositivo intravaginal de P4 após IA, verificou-se que vacas lactantes da raça Holandesa apresentaram superior taxa de prenhez comparadas ao grupo controle (ROBINSON et al., 1989), corroborando com os dados apresentados acima. Ainda, recentemente, em estudo realizado em vacas de corte lactantes em anestro, o tratamento com 150 mg de P4LA quatro dias após a IATF determinou aumento da taxa de prenhez em relação ao grupo não tratado (55,6% vs 46,0%; $P=0,05$). Contudo, os

mesmos pesquisadores trabalhando com animais cíclicos (com presença de CL) não notaram qualquer efeito positivo sobre a fertilidade dos animais tratados com P4LA (PUGLIESI, et al., 2015).

Entretanto, Parr et al. (2104) reportaram dados contrários, nos quais vacas lactantes da raça Holandesa tratadas com um dispositivo intravaginal de progesterona 4 dias após a IA resultaram em menor taxa de prenhez quando comparadas ao grupo controle [grupo suplementado 102/232 (44%) x grupo controle 123/221 (56%)]. O mesmo também foi relatado por Van Cleeff et al. (1996), que trabalhando com novilhas da raça Holandesa tratadas com um implante de progesterona entre o dia 1 ou 2 após IATF, reportaram inferior taxa de prenhez em relação ao grupo controle (grupo controle = 43,5% x grupo tratado = 18,2%). Desta forma, o efeito positivo da manipulação estratégica com P4 no período após inseminação parece ser dependente, além da dose e do momento nos quais o tratamento é realizado, da categoria animal. Esses dados são indicativos de que estudos prospectivos ainda são necessários para ajustar o momento ideal do ciclo estral em que a P4 exógena deve ser ministrada, bem como a dosagem conforme a categoria animal, visando a viabilização dessa ferramenta como fator de impacto nos índices reprodutivos.

No presente estudo, os animais do grupo tratado com hCG não apresentaram aumento na taxa de concepção aos 30 e 60 dias. Lonergan (2011) realizou uma compilação de 16 estudos sobre a utilização de hCG como estratégia para incremento da concentração de P4 e de concepção em bovinos. Apesar da maioria dos trabalhos demonstrarem aumento da concentração de P4 após o tratamento (MARQUES et al., 2012), apenas sete em dezenove reportaram efeito positivo do tratamento com hCG na taxa de concepção. No presente estudo, verificou-se aumento da concentração plasmática de P4, entretanto, somente 6 dias após o tratamento com hCG. Esse atraso no aumento da concentração circulante de P4 pode explicar, em parte, a ausência de efeito positivo na concepção, uma vez que trabalhos científicos associaram a necessidade de aumento precoce da P4 para obtenção de melhoras no ambiente uterino, aumento no crescimento do conceito, e maior estabelecimento da gestação (CARTER et al., 2008).

A administração de hCG associado ao tratamento com P4LA não aumentou a taxa de concepção. O hCG estimula o crescimento das células luteínicas grandes, responsáveis por cerca de 80% da síntese de P4 no CL (SCHMITT et al., 1996). Dessa forma, esperava-se que o tratamento com hCG poderia minimizar o possível efeito negativo de elevadas concentrações de P4 na formação do CL. Provavelmente, o fato do tratamento com P4LA não ter reduzido a

funcionalidade do CL, pode justificar a ausência do efeito positivo dessa associação na taxa de concepção.

No presente estudo também foram avaliadas as possíveis interações entre os tratamentos e os fatores relacionados ao clima (época do ano), bem como às diferentes fazendas utilizadas. Pode-se notar que, independentemente dos tratamentos, as taxas de concepção aos 30 e 60 dias foram significativamente superior na fazenda B em relação a A. Ainda, aos 60 dias de gestação, o efeito positivo do tratamento com P4LA foi observado apenas na fazenda B. Algumas diferenças foram notadas entre as fazendas, tais com ambiência e manejo, que poderiam justificar essa interação. A fazenda A trabalha atualmente com ambiente mais controlado, já que os animais estão instalados em sistema de “free-stall” fechado, do tipo ventilação cruzada, com temperatura interna controlada e média diária de produção de leite por animal de $40,9 \pm 10,6$ L. Já a propriedade B trabalha com sistema “free-stall”, baia de estabulação livre, do modo convencional, com média diária de produção de leite por animal de $27,4 \pm 7,8$ L. A diferença de produtividade entre as propriedades poderia determinar a interação entre fazendas e tratamento com P4LA sobre a taxa de concepção. O catabolismo de esteroides dos animais na fazenda A é potencialmente mais elevado em consequência de sua maior produção em comparação a fazenda B. Ainda, decorrente dessa possibilidade, a dose utilizada nestes animais poderia também não ter sido suficiente para alterar a receptividade uterina à gestação e, conseqüentemente, aumentar a taxa de concepção. Estes efeitos são baseados em princípios bem estabelecidos que demonstram o impacto da produção de leite afetando negativamente a duração e intensidade do estro (LOPEZ et al., 2004) e positivamente o catabolismo hepático dos hormônios esteroides, tais como P4 e 17β – estradiol (SANGSRITAVANG et al. 2002).

Ainda, conforme esperado, a taxa de concepção foi alterada de acordo com a época do ano (época quente e época não quente) em que o protocolo de IATF foi realizado. Fêmeas que foram inseminadas durante os meses quentes apresentaram menores taxas de concepção, tanto aos 30 como para os 60 dias. Esses resultados estão de acordo com os dados encontrados em diferentes estudos realizados em vacas lactantes de alta produção da raça Holandesa (SOUZA et al., 2006; SARTORI et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007). A este fato pode-se atribuir que durante o período quente do ano estes animais são mais prejudicados pelo estresse térmico que tem como principais consequências a redução na qualidade oocitária (HANSEN & ARECHIGA 1999; FERREIRA et al., 2011) e no desenvolvimento embrionário inicial (EALY et al., 1993).

Tal efeito negativo do estresse por calor sobre a qualidade oocitária foi descrito tanto para fêmeas zebuínas quanto para fêmeas taurinas. Em fêmeas zebuínas da raça Gir (*B. indicus*)

foi observado efeito do estresse calórico induzido na redução de ingestão de matéria seca e no aumento do período de anestro ($P4 < 1 \text{ ng/mL}$), da ocorrência de codominância folicular (aumento do número de folículos maiores que nove milímetros), bem como na redução da duração do ciclo estral (TORRES-JUNIOR et al., 2008). Em fêmeas taurinas, ao comparar diferentes categorias de fêmeas da raça Holandesa (novilhas vs vacas lactantes em pico de produção vs vacas repetidoras de serviço) submetidas a programas de aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões, Ferreira et al. (2011) observaram maior impacto negativo do estresse calórico sobre a taxa de blastocisto durante o verão em vacas lactantes em relação às novilhas. Os mesmos autores, além dessa menor taxa de produção embrionária, observaram alterações nos parâmetros fisiológicos, tais como taxa de respiração, temperaturas retais e cutâneas (FERREIRA et al., 2011). Em um estudo retrospectivo com vacas de leite de alta produção comparando diferentes manejos reprodutivos (IA vs TE; RODRIGUES et al., 2007) demonstrou-se que durante o período quente do ano há redução nas taxas de concepção, independente do manejo empregado, sendo o impacto negativo maior para IA. Este dado reforça o fato de que independente da categoria animal e do manejo empregado, durante o período quente do ano há redução significativa nas taxas de concepção, sendo essencial o desenvolvimento de ferramentas para contornar o efeito deletério do estresse térmico.

Nesse sentido, os dados do presente estudo demonstraram que a administração de P4LA-900 durante a época quente do ano pode ser considerada como ferramenta auxiliar para o incremento da fertilidade de fêmeas Holandesas de alta produção. Ainda, acredita-se que o efeito do metabolismo hepático sobre estes hormônios se torna mais evidente durante períodos de estresse calórico, alterando ainda mais o crescimento folicular, a qualidade do oócito e as taxas de concepção em fêmeas bovinas (SARTORI et al., 2002; TORRES-JUNIOR et al., 2008; WILSON et al., 1998). Desta forma o efeito positivo do tratamento com P4LA durante o início do diestro de vacas Holandesas de alta produção parece ser mais evidente quando realizado durante períodos de maiores temperaturas.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo (Experimento 1) confirmam a hipótese de que o perfil plasmático de P4 após a aplicação de P4LA é dose dependente. Dessa forma, para obtenção de concentrações plasmáticas de P4 acima de 1ng/ml por 9 dias foi necessária a administração de 900mg de P4LA.

No Experimento 2, o tratamento com P4LA-900 aumentou a concentração plasmática de P4 sem comprometer a formação e a funcionalidade do CL, rejeitando a hipótese do presente experimento. O tratamento com hCG promoveu aumento no volume do CL e na concentração plasmática de P4, confirmando a hipótese inicial. A associação do tratamento com hCG e P4LA-900 não melhorou o desenvolvimento do CL, rejeitando a hipótese do presente experimento.

No Experimento 3, verificou-se que o tratamento com P4LA-900 aumentou a taxa de concepção 30 dias após a IATF. No entanto, o tratamento com hCG associado a P4LA-900, não aumentaram a taxa de concepção após IATF. Esses resultados rejeitam as hipóteses do presente estudo.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS

Existe a necessidade da otimização dos resultados reprodutivos para a pecuária leiteira moderna, porém nas últimas décadas foi constatada relação inversa entre produção de leite e taxa de prenhez. Além disso, outros fatores como época do ano (quente x frio), produtividade, sistema de produção, metabolização hepática de hormônios esteroides, entre outros, podem também inferir na eficiência reprodutiva. Vários estudos foram indicativos de que existe redução anual de 0,6% na taxa de concepção de vacas de leite nos últimos 50 anos (MANN 2002).

Novas estratégias têm sido desenvolvidas na tentativa de minimizar esses efeitos negativos na fertilidade. Nesse contexto, programas reprodutivos baseados no uso de tratamentos hormonais para aumentar as concentrações circulantes de P4 antes e após a IA foram estabelecidos. Alguns pesquisadores verificaram que a introdução de um dispositivo de P4 em programas com Ovsynch aumenta de 5 a 7% a taxa de concepção (STEVEYSON et al., 2006, 2008; CHEBEL et al., 2010). Também, foi constatado que tratamentos realizados após a IA aumentam a taxa de concepção por melhorar o ambiente uterino, favorecer o desenvolvimento e a implantação do embrião e a manutenção da gestação (ARCK et al., 2007; PUGLIESI et al 2015).

Os dados do presente estudo corroboram com as informações de que é possível aumentar a eficiência reprodutiva com o tratamento com P4 após a IATF. O efeito positivo foi da suplementação com P4 foi mais evidente na época quente do ano, período crítico para a reprodução principalmente nos países tropicais. Ainda, verificou-se que o tratamento com P4LA-900 apresentou respostas diferentes conforme a fazenda, sugerindo que efeitos como manejo, alimentação, produção diária de leite e ambiência podem estar diretamente relacionados com a resposta ao tratamento.

Essas informações contribuem para que novas estratégias sejam estabelecidas para aumentar a eficiência reprodutiva de vacas de leite de alta produção.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; KOT, K.; SMITH, C. A.; GINTHER, O. J. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates. **Canadian Journal Animal Science**, v. 73, n. 1, p. 267-275, 1992a.
- ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992b.
- ANDERSON, L. E., WU, Y., TSAI, S.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ receptor in the Corpus Luteum: recent information on the gene, messenger ribonucleic acid, and protein. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1041-1047, 2001.
- ANUALPEC 2014: anuário da pecuária brasileira. 21th ed. São Paulo: Informa Economics FNP; 2014.
- ARCK, P.; HANSEN, P.J.; JERICEVIC, B. M.; PICCINNI, M. P.; SZEKERES-BARTHO, J. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 58, p. 268-279, 2007.
- ASHWORTH, C. J.; SALES, D. I.; AND WILMUT, I. Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 87, 23–32, 1989.
- BADINGA, L., W. W. THATCHER, T. DIAZ, M. DROST, AND D. WOLFENSON. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. **Theriogenology** 39:797–810, 1993.
- BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 1903-1921, 1998
- BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; PINHEIRO, O. L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, p. 9-12, 1995.
- BARUSELLI PS, FERREIRA RM, SALES JN, GIMENES LU, SÁ FILHO MF, MARTINS CM, RODRIGUES CA, BÓ GA. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1583-1593, 2011.
- BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C. Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 3, p. 745-767, 2011.
- BELTMAN ME, LONERGAN P, DISKIN MG, ROCHE JF, CROWE MA. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1173-1179, 2009.

BILBY TR, BRUNO RG, LAGER KJ, CHEBEL RC, MORAES JG, FRICKE PM, LOPES G JR, GIORDANO JO, SANTOS JE, LIMA FS, STEVENSON JS, PULLEY SL. Supplemental progesterone and timing of resynchronization on pregnancy outcomes in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 11 p. 7032-7042, 2013.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1451– 63, 2001.

BINELLI, M.; SARTORI, R.; VASCONCELOS, J. L. M.; MONTEIRO JR, P. L. J.; PEREIRA, M. H. C.; RAMOS, R. S. Evolution in fixed-time: from synchronization of ovulation to improved fertility. In: JUENGEL, J. L.; MIYAMOTO, A.; PRICE, C.; REYNOLDS, L. P.; SMITH, M. F.; WEBB, R. (Org.). **Reproduction in domestic ruminants VIII**. Ashby de la Zouch: Context, 2014. v. 1, p. 493-506.

BISINOTTO, R.S.; RIBEIRO, E.S.; MARTINS, L.T.; MARSOLA, R.S.; GRECO, L.F.; FAVORETO, M.G.; RISCO, C.A.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E. 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. *J Dairy Sci* **93** 5798-5808, 2010.

BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M.; ROCHA JUNIOR, V. R.; RUAS, J. R. M.; GIOSO, M. M.; FONSECA, J. F.; CARVALHO, G. R.; MAFFILI, V. V. Follicular dynamic and ovulation time of non-lactating Gir and Nelore cows during two seasons of the year. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 80, n. 5, p. 346-354, 2004.

BURNS, P. D.; GRAF, G. A.; HAYES, S. H.; SILVIA, W. J. Cellular mechanisms by which oxytocin stimulates uterine PGF_{2α} synthesis in bovine endometrium: roles of phospholipases C and A₂. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, p. 181-191, 1997.

CARLSON, J. A.; BUHR, M.; WENTWORTH, R.; HANSEL, W. Evidence of membrane changes during regression in the bovine corpus luteum. **Endocrinology**, v.110, p.1472-1476, 1982

CARTER F1, FORDE N, DUFFY P, WADE M, FAIR T, CROWE MA, EVANS AC, KENNY DA, ROCHE JF, LONERGAN P. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction Fertility and Development**, v. 20, n. 3, p. 368-375, 2008.

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

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

CHANNING, C. P. Steroidogenesis and morphology of human ovarian cell types in tissue culture. **Journal of Endocrinology**, v. 45, p. 297-308, 1969.

CHEBEL, R. C.; AL-HASSAN, M. J.; FRICKE, P. M.; SANTOS, J. E. P.; LIMA, J. R.; MARTEL, C. A.; STEVENSON, J. S.; GARCIA, R.; AX, R. L. Supplementation of progesterone via controlled internal drug release inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 922-931, 2010.

CHEGINI, N.; LEI, M.; RAO, C. V.; HANSEL, W. Cellular distribution and cycle phase dependence of gonadotropin and eicosanoid binding sites in bovine corpora lútea. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 506-513, 1991.

COLAZO, M. G.; MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 2295, p. 1-16, 2002.

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

DISKIN, M. G.; PARR, M. H.; MORRIS, D. G. Embryo death in cattle: an update. **Reproduction Fertility and Development**, v. 24, p. 244-251, 2012.

EALY, A.D.; DROST, M.; HANSEN, P.J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **J. Dairy Sci**; 76:2899-2905, 1993.

FARIN, C. E.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R.; GAMBONI, F.; NISWENDER, G. D. Morphometric analysis of cell types in the bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 35, p. 1299-1308, 1986.

FERGUSON, J.O., GALLIGAN, D.T., THOMSEN, N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. **J. Dairy Sci**. 77, 2695–2703, 1994.

FERREIRA RM1, AYRES H, CHIARATTI MR, FERRAZ ML, ARAÚJO AB, RODRIGUES CA, WATANABE YF, VIREQUE AA, JOAQUIM DC, SMITH LC, MEIRELLES FV, BARUSELLI PS. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2383-2392, 2011.

FERREIRA S. A.; VANE, J. R. Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. **Nature**, v. 216, p. 868-873, 1967.

- FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous and pregnancy **Theriogenology**, v. 45, p. 1295-1325, 1996.
- FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; DUFFY, G. B.; DUFFY, P.; MEHTA, J. P.; O'GAORA, P.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; CROWE, M. A. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. **Biology of Reproduction**, v. 84, p. 266-278, 2011.
- FORDE, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; CROWE, M.A.;EVANS, A.C.O.; SPENCER, T.E.; BAZER, F.W.; MCBRIDE, R.; BOLAND, M.P.; O'GAORA, P.; LONERGAN, P.; ROCHE, J.F. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol Reprod* 81, 784–794, 2009.
- GARRETT, J.E.; GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T.; GRIESLK WETTEMANN, R.P.; BUCHANAN, D.S. Effect of exogenous progesterone on prostaglandin F2a release and the interestrous interval in the bovine. *Prostaglandins* 36, 85–96, 1998.
- GARVERICK, H. A.; ZOLLERS, W. G.; SMITH, M. F. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. **Animal Reproduction Science**, v. 28, n. 1-4, p. 111-124, 1992.
- GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 852-858, 2008.
- GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 239-257, 2003.
- GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 197-205, 2001.
- GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Journal of Animal Reproduction Science**, v. 20, n. 3, p. 187-200, 1989a.
- GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Intraovarian relationship among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**, v. 32, n. 5, p. 787-795, 1989b.
- GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.
- HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 1995, v. 6. 582 p. (Ciclos reprodutivos).

- HANLON, D. W.; JARRATT, G. M.; DAVIDSON, P. J.; MILLAR, A. J.; DOUGLAS, V. L. The effect of hCG administration five days after insemination on the first service conception rate of anestrous dairy cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 1938–45, 2005.
- IRELAND, J. J.; MURPHEE, R. L.; COULSON, P. B. Accuracy of Predicting Stages of Bovine Estrous Cycle by Gross Appearance of the Corpus Luteum. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 1, p. 155-160, 1980.
- JOHNSON, K. R. Effect of 17 alpha-hydroxyprogesterone 17-ncaproate on the reproductive performance of cattle. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 71, p. 577–9, 1958.
- KOTWICA, J.; BOGACKI, M.; REKAWIECKI, R. Neural regulation of the bovine corpus luteum. **Domestic animal Endocrinology**, v. 5341, p. 1-10, 2002.
- KRISANS, S. K. Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis. **Annual NY Academic Science**, v. 804, p. 142-164, 1996.
- LEVY, N.; KOBAYASHI, S.; ROTH, Z.; WOLFENSON, D.; MIYAMOTO, A.; MEIDAN, R. Administration of prostaglandinF2 α during the early bovine luteal phase does not alter the expresion of ET-1 and its type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 377-382, 2000.
- LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1594-1601, 2011.
- LOPEZ H, CARAVIELLO DZ, SATTER LD, FRICKE PM, WILTBANK MC. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 8 p. 2783-2793, 2005.
- LOPEZ, H.; SATTER, L.D.; WILTBANK, M.C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* **81** 209-223, 2004.
- LUCY MC. Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? **Journal of Dairy Science** 84, 1277-1293, 2001.
- MAILLO, V.; DUFFY, P.; O'HARA, L.; DE FRUTOS, C.; KELLY, A. K.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. Effect of hCG administration during corpus luteum establishment on subsequent corpus luteum development and circulating progesterone concentrations in beef heifers. **Reproduction Fertility and Development**. v. 26, p. 367-374, 2013
- MANN GE, FRAY MD, LAMMING GE. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. **The Veterinary Journal** v. 171, n. 3, p. 500-503, 2006.
- MANN, G. E., M. D. FRAY, AND G. E. LAMMING. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. **Vet. J.** 171:500-503, 2006

MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, p. 175–80, 2001.

MANN, G.E. Reproduction-mating management. In: Encyclopaedia of Dairy Sciences Eds JW Fuquay and PF Fox. **Academic Press, San Diego, USA**, pp1770 – 1777, 2002.

MARQUES MO, NASSER LF, SILVA RCP, BO GA, SALES JNS, SA FILHO MF, REIS EL, BINELLI M, BARUSELLI PS. Follicular dynamics and pregnancy rates in Bos taurus x Bos indicus embryo transfer recipients treated to increase plasma progesterone concentrations. **Animal Reproduction**, v.9, p.11-119, 2012.

MCNEILL, R.E.; SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G.; CAIRNS, M.T.; FITZPATRICK, R.; SMITH, T.J.; MORRIS, D.G. Effect of systemic progesterone concentration on the expression of progesterone-responsive genes in the bovine endometrium during the early luteal phase. **Reprod Fertil Dev**; 18:573–583, 2006.

MEIDAN, R.; LEVY, N. Endothelin-1 receptors and biosynthesis in the corpus luteum: molecular and physiological implications. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 287-298, 2002.

MIES FILHO, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. Porto Alegre, RS: Sulina, **Biblioteca Rui Tendinha**. v. 1, n. 4, p. 359, 1977.

MILVAE, R. A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandinF2_α in corpus luteum function. **Reviews of Reproduction**, v. 5, p. 1-5, 2000.

MILVAE, R. A.; HINCKLEY, S. T.; CARLON, J. C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 45, p. 1327-1349, 1996.

MIYAMOTO, A. Intraluteal mechanisms involved in prostaglandinF2_α-induced luteolysis in Ewes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 42, p. 61-63, 1996. Supplement.

MOMONT, H. W. Influence of day of estrous cycle on response to PGF2_α products: implications for AI programs for dairy cattle. Proc. Int. Cong. Anim. Reprod. **Animal Reproduction Science**, v. 28, n. 3, p. 327, 1992.

MONTEIRO JR., P. L. J.; RIBEIRO, E. S.; MACIEL, R. P.; DIAS, A. L. G.; SOLÉ JR., E.; LIMA, F. S.; BISINOTTO, R. S.; THATCHER, W. W.; SATORI, R.; SANTOS, J. E. P. Effects of supplemental progesterone after artificial insemination on expression of interferon-stimulated genes and fertility in dairy cows”. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 8, p. 4907-4921, 2014.

N. FORDE, G. B. DUFFY, P. A. MCGETTIGAN, J. A. BROWNE, J. P. MEHTA, A. K. KELLY, N. MANSOURI-ATTIA, O. SANDRA, B. J. LOFTUS, M. A. CROWE, T. FAIR, J. F. ROCHE, P. LONERGAN, A. C. O. EVANS. interferon tau in cattle: both dependent upon

and independent of Evidence for an early endometrial response to pregnancy. **Physiol. Genomics** 44:799-810, 2012.

NASCIMENTO AB, SOUZA AH, GUENTHER JN, COSTA FP, SARTORI R, WILTBANK MC. Effects of treatment with human chorionic gonadotrophin or intravaginal progesterone-releasing device after AI on circulating progesterone concentrations in lactating dairy cows. **Reproduction Fertility and Development**, v. 25, n. 5, p. 818-824, 2013.

NEBEL, R.L.; JOBST, S.M.; DRANSFIELD, M.B.G.; PANSOLFI, S.M.; BAILEY, T.L. Use of a radio frequency data communication system, HeatWatch®, to describe behavioral estrus in dairy cattle. *J Dairy Sci* **80 (Suppl. 1)** 151 Abstract, 1997.

NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v. 123, p. 333-339, 2002.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYNSON, M. K.; MCINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p.1-29, 2000.

O'HARA, L. O.; FORDE, N.; CARTER, F.; RIZOS, D.; MAILLO, V.; EALY, A. D.; KELLY, A. K.; RODRIGUEZ, P.; ISAKA, N.; EVANS, A. C. O.; LONERGAN, P. Paradoxical effect of supplementary progesterone between day 3 and 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. **Reproduction Fertility Development**, Dev. 26, 328–336, 2013.

O'SHEA, J.D.; RODGERS, R. J.; D'OCCHIO, M. J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, p. 483-487, 1989.

OHTANI, M.; KOBAYASHI, S.; MIYAMOTO, A.; HAYASHI, K., FUKUI, Y. Real-time relationships between intraluteal and plasma concentrations of endothelin, oxytocin, and progesterone during prostaglandinF2 α - induced luteolysis in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 103-108, 1998.

PARR MH, CROWE MA, LONERGAN P, EVANS AC, RIZOS D, DISKIN MG. Effect of exogenous progesterone supplementation in the early luteal phase post-insemination on pregnancy per artificial insemination in Holstein-Friesian cows. **Animal Reproduction Science**, v. 150, n. 1-2 p. 7-14, 2014.

PARRY, D. M.; WILLCOX, D. L.; THORBURN, G. D. Ultrastructural and cytochemical study of the bovine corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 349-357, 1980.

PATE, J. L. Cellular components involved in luteolysis. **Journal Animal Science**, v. 72, p. 1884-1890, 1994.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Follicular population during the estrous cycle in heifers: III. Time of selection of the ovulatory follicle. **Journal of Animal Reproduction Science**, v. 16, n. 2, p. 81-95, 1988.

- PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonograph of bovine ovary. **Theriogenology**, v. 21, n. 3, p. 495-504, 1984.
- PUGLIESI, G.; OLIVEIRA, M. L.; SCOLARI, S. C.; LOPES, E.; PINAFFI, F. V.; MIAGAWA, B. T.; PAIVA, Y. N.; MAIO, J. R. G.; NOGUEIRA, G. P.; BINELLI, M. Corpus luteum development and function after supplementation of long-acting progesterone during the early luteal phase in beef cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 85-91, 2014.
- RAJAKOSKI, E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonally, cyclical, and left-right variations. **Acta Endocrinology**, v. 34, p. 7-68, 1960.
- REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the ovary. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 182-192, 1996.
- RIVERA, G. M.; CHANDRASEKHER, Y. A.; EVANS, A. C.; GIUDICE, L. C.; FORTUNE, J. E. A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 1, p. 102-111, 2001.
- RIVERA, G. M.; FORTUNE, J. E. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 1, p. 112-118, 2001.
- ROBERSON, M. S.; WOLFE, M. W.; STUMPF, T. T.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 997-1003, 1989.
- ROBINSON, N. A.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. **J Dairy Sci.** v. 72, p. 202-7, 1989.
- RODRIGUES, C. A., H. AYRES, R. M. FERREIRA, A. A. TEIXEIRA, R. F. MANCILHA, M. E. F. OLIVEIRA, A. H. SOUZA, AND P. S. BARUSELLI. Comparison of pregnancy rates after artificial insemination or embryo transfer in high-producing repeat breeder Holstein cows. **Acta Sci. Vet.** 35:s1255, 2007.
- SAKAMOTO, K.; MIWA, K.; EZASHI, T.; OKUDA-ASHITAKA, E.; OKUDA, K.; HOUTANI, T.; SUGIMOTO, T.; ITO, S.; HAYAISHI, O. Expression of mRNA encoding the prostaglandinF2 α receptor in bovine corpora lutea throughout the oestrous cycle and pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 99-105, 1995.
- SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D.K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L.E.; WILTBANK, M.C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. **J Dairy Sci** 85 2831-2842, 2002.

- SANTOS, J. E.; THATCHER, W. W.; POOL, L.; OVERTON, M. W. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 7, p. 2881-2894, 2001
- SARTORI, R. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 153-159, 2007.
- SARTORI, R.; GÜMEN, A.; GUENTHER, J. N.; SOUZA, A. H.; CARAVIELLO, D. Z.; WILTBANK, M. C. Comparision of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 65, p. 1311-1321, 2006.
- SARTORI, R.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Ovarian Structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2813-2822, 2002.
- SAS Statistical Analysis System. SAS/STAT User's Guide, Release 6.03. Cary NC: SAS Institute Inc, 2000
- SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, R. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, n. 2, p. 111-119, 1988.
- SCHMITT, E. J., BARROS, C. M., FIELDS, P. A., FIELDS, M. J., DIAZ, T., KLUGE, J. M., AND THATCHER, W. W. A cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin on day five of the estrous cycle. **J. Anim. Sci.** **74**, 1915–1929, 1996.
- SHEMESH, M. Actions of gonadotropins on the uterus. **Reproduction**, v. 121, p. 835-842, 2001.
- SOUZA, A.H.; AYRES, H.; FERREIRA, R.M.; WILTBANK, M.C. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. **Theriogenology** ;70:208 –15, 2008.
- SOUZA, E. D. F.; SALA, R. V.; ORTOLAN, M. D. D. V.; AZRAK, A. J.; MAIO, J. R. G.; TEIXEIRA, A. A.; BASTOS, M. R.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Effects of exogenous progesterone on luteal function of high production dairy cows. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3 p. 446, 2013. Trabalho apresentado no Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), Praia do Forte. Proceedings.
- SPICER, L. J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S. E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 5, p. 1232-1241, 1993.

- SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 12, p. 223-245, 1995.
- SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1997. 545 p.
- STEPIEN, A.; SHEMESH, M.; ZIECIK, A. J. Luteinizing hormone receptor kinetic and LH induced prostaglandin production throughout the oestrous cycle in porcine endometrium. **Reproduction Nutrition and Development**, v. 39, p. 663-674, 1999.
- STEVENSON, J. S.; PURSLEY, J. R.; GARVERICK, H. A.; FRICKE, P. M.; KESLER, D. J.; OTTOBRE, J. S.; WILTBANK, M. C. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2567-2578, 2006.
- STEVENSON, J. S.; TENHOUSE, D. E.; KRISHER, R. L.; LAMB, G. C.; LARSON, J. E.; DAHLEN, C. R.; PURSLEY, J. R.; BELLO, N. M.; FRICKE, P. M.; WILTBANK, M. C.; BRUSVEEN, D. J.; BURKHART, M.; YOUNGQUIST, R. S.; GARVERICK, H. A. Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 2901-2915, 2008.
- STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 1108-1114, 1993.
- STRONGE, A.J.H.; SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G.; MEE, J.F.; KENNY, D.A.; MORRIS, D.G. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. **Theriogenology**, 64, 1212–1224, 2005.
- SWAN, R. T.; BRUCE, N. W. Oxygen consumption, carbon dioxide production and progestagen secretion in the intact rat ovary of the day-16 pregnant rat. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 599-605, 1987.
- THATCHER, W. W.; CHENAULT, J. R. Reproductive physiological responses of cattle to exogenous prostaglandin F_{2α}. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 7. p. 1366-1375, 1976.
- THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J. K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1435-1450, 2001.
- TORRES-JUNIOR, J. R. S.; PIRES, M. F. A.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H.; CAMARGO, L. S.; RAMOS, A. A.; FOLHADELLA, I. M.; POLISSENI, J.; FREITAS, C.; CLEMENTE, C. A.; SÁ FILHO, M. F.; PAULA-LOPES, F. F.; BARUSELLI, P. S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 155-166, 2008.

- TSAI, S.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin F₂ α regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 346-352, 1998.
- TSAI, S.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin F₂ α induces expression of prostaglandin G/H Synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1016-1022, 1997.
- VACA, L. A.; GALINA, C. S.; FERNANDEZ-BACA, S.; ESCOBAR, F. J.; RAMÍREZ, B. Oestrous cycles, oestrus and ovulation of the Zebu in the Mexican tropics. **The Veterinary Record**, v. 117, n. 26, p. 434-437, 1985.
- VAN CLEEFF, J.; MACMILLAN, K. L.; DROST, M.; LUCY, M. C.; THATCHER, W. W. Effects of administering progesterone at select intervals after insemination of synchronized heifers on pregnancy rates and resynchronization of returns to service. **Theriogenology**, v. 46, p. 1117-1130, 1996.
- VAN WERVEN, T.; WALDECK, F.; SOUZA, A.H.; FLOCH, S.; ENGLEBIENNE, M. Comparison of two intravaginal progesterone releasing devices (PRID-Delta vs CIDR) in dairy cows: Blood progesterone profile and field fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 138, p. 143-149, 2013.
- VASCONCELOS, J. L.; SÁ FILHO, O. G.; JUSTOLIN, P. L.; MORELLI, P.; ARAGON, F. L.; VERAS, M. B.; SORIANO, S. Effects of postbreeding gonadotropin treatments on conception rates of lactating dairy cows subjected to timed artificial insemination or embryo transfer in a tropical environment. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 223-234, 2011.
- VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Regressão luteal e dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida por cloprostenol em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 257-262, 1999
- WASHBURN, S. P.; W. J. SILVA, C. H. BROWN, B. T. MCDANIEL, A. J. MCALLISTER. Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. **J. Dairy Sci.** 85:244–251, 2002.
- WILSON, S. J., R. S. MARION, J. N. SPAIN, D. E. SPIERS, D. H. KEISLER, M. C. LUCY. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. lactating cows. **J. Dairy Sci.** 81:2124–2131, 1998.
- WILTBANK, M. C.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, p. 17-29, 2006.
- WILTBANK, M. C.; SHIAO, D. R.; GINTHER, O. J. Prostaglandin F₂ α Receptors in the early bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 74-78, 1995.
- WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; BENDER, R. W.; NASCIMENTO, A. B. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating

progesterone concentrations in lactating dairy cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v. 24, p. 238-243, 2012.

WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; GIORDIANO, A. B.; NASCIMENTO, A. B.; VASCONCELOS, J. M.; PEREIRA, M. H.C .; FRICKE, P. M.; SURJUS, R. S.; ZINSLY, F. C. S.; CARVALHO, P. D.; BENDER, R. W.; SARTORI, R. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 231-241, 2012.

WILTBANK, M.C. J Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. **Journal Animal Science**, v. 72, p. 1873-1883, 1994.