

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO - CÂMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

INCREMENTO DE PROGESTERONA PÓS-INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL EM VACAS LEITEIRAS

Autora: Thaisa Campos Marques

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karen Martins Leão

RIO VERDE - GO

dezembro - 2012

INCREMENTO DE PROGESTERONA PÓS-INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM VACAS LEITEIRAS

Autora: Thaisa Campos Marques

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karen Martins Leão

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde – Área de concentração Zootecnia

Rio Verde - GO

dezembro - 2012

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**INCREMENTO DE PROGESTERONA PÓS-INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL EM VACAS LEITEIRAS**

Autora: Thaisa Campos Marques
Orientadora: Karen Martins Leão

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia – Área de concentração
Zootecnia – Zootecnia e Recursos Pesqueiros.

APROVADA em 10 de dezembro de 2012.

Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Gambarini
Avaliadora externa
UFG

Prof^a. Dr^a. Kátia Cyrene Guimarães
Avaliadora interna
IF Goiano/RV

Prof^a. Dr^a. Karen Martins Leão
Presidente da banca
IF Goiano/RV

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela força, sabedoria e paciência nos momentos de dificuldade, dando-me impulso para concluir não apenas este trabalho, mas na condução de minha vida.

Aos meus pais pelo amor, esforço e incentivo para me educar e colocar na direção correta para que tornasse uma pessoa de bem.

Ao meu esposo Marcus Vinícius, pelo amor, carinho, paciência, cuidado, amizade e companheirismo em todos os momentos de nossa vida, apoiando-me e dando o suporte incondicional para a conclusão das aulas, experimento e dissertação.

À minha irmã Cristhiane pela amizade, companheirismo e auxílio nos momentos de alegrias e dificuldades. Ao meu sobrinho Felipe, pelas alegrias que uma criança proporciona e nos estimula, dando-nos esperança de um amanhã melhor.

À minha orientadora Karen, que se disponibilizou para o desenvolvimento do meu projeto, pela atenção, amizade e parceria a mim concedidos.

À tia Idelma, que é uma segunda mãe, dando-me suporte espiritual em todas as fases de minha vida.

Às minhas amigas e companheiras de trabalho Melissa e Patrícia, que auxiliaram prontamente nos serviços nas fazendas de nossos clientes enquanto eu cumpria os créditos para o mestrado.

Às meninas da reprodução, Natália, Moraima e Rossane, que cresceram e aprenderam muito durante o mestrado.

Ao Fabiano Guimarães pela amizade e atenção nos momentos em que precisei, reavivando alguns dons adormecidos e caminhos que eu jamais pensei em trilhar.

À professora Kátia Cylene, pela amizade, disponibilidade, aprendizado e oportunidades a mim concedidos.

Ao professor Marco Viu, que, além da disponibilidade e auxílio, mostrou que independente do momento que estamos vivendo, devemos acreditar em nós e em nossa família para vencermos os obstáculos que a vida nos impõe.

À secretária Renata que, sempre com um sorriso no rosto, incentivou-me a seguir em frente e não desperdiçar meu potencial de pesquisadora.

À Maria Lúcia Gambarini pela aceitação do convite em participar de minha banca, enriquecendo minha dissertação.

À FAPEG, pela concessão do auxílio financeiro que muito me ajudou na execução do projeto.

Aos proprietários e funcionários da Fazenda Gamela, que não mediram esforços para a execução e conclusão do experimento.

À empresa de produtos veterinários BIOGÊNESIS-BAGÔ, pelos hormônios do experimento.

À empresa de produtos veterinários MSD SAÚDE ANIMAL, pelos kits para a realização das dosagens hormonais em parceria com a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo.

Ao Instituto Federal Goiano pela concessão do mestrado, enriquecendo ainda mais meus conhecimentos.

E, finalmente, a todos os colegas de mestrado, pela convivência durante o curso.

BIOGRAFIA DO AUTOR

THAISA CAMPOS MARQUES, filha de Gentil de Gouveia Marques e Roseli Maria Campos Marques, nasceu em Rio Verde - Goiás, em 16 de setembro de 1978. Em agosto de 1999, iniciou o Curso de Medicina Veterinária na UFLA - Universidade Federal de Lavras, graduando-se em julho de 2004. Trabalhou na empresa Zigoto Reprodução Bovina e TE na região de Bauru, São Paulo entre 2004 e 2006. Retornou para sua cidade natal, onde atualmente presta assessoria na área de reprodução bovina. Entre 2009 e 2011, especializou-se em Pecuária Leiteira pela Rehagro e em Produção e Reprodução de Bovinos pela Qualittas. Em agosto de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, na área de Produção Animal submetendo-se à defesa da dissertação, requisito indispensável para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia, em dezembro de 2012.

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	vii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Revisão de literatura.....	3
1.1.1. Progesterona	3
1.1.2. Desenvolvimento embrionário	4
1.1.3. Reconhecimento materno da gestação	4
1.1.4. Progesterona na regulação da expressão gênica no útero	6
1.1.5. Estratégias para aumentar os níveis de progesterona pós-concepção em vacas.....	8
1.1.5.1 Alternativas utilizadas antes da inseminação artificial	8
1.1.5.2 Alternativas utilizadas após a inseminação artificial	9
1.2. Justificativa e relevância.....	10
1.3. Referências bibliográficas.....	10
2. OBJETIVOS GERAIS	19
3. TRABALHO CIENTÍFICO.....	21
PROGESTERONA PÓS-INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E DESEMPENHO REPRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS.....	21
Resumo.....	21
Abreviações.....	22
Introdução.....	22

Material e Métodos.....	23
<i>Local do experimento.....</i>	23
<i>Condução do experimento.....</i>	24
<i>Avaliação e preparação dos animais.....</i>	24
<i>Grupos experimentais.....</i>	25
<i>Coleta das amostras de sangue e dosagem de progesterona sérica.....</i>	26
<i>Diagnóstico de gestação.....</i>	26
<i>Delineamento estatístico.....</i>	26
Resultados e Discussão.....	27
Conclusão.....	34
Referências bibliográficas.....	35

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Média e desvio padrão do índice de temperatura e umidade (ITU) do dia da inseminação artificial em tempo fixo entre os períodos de temperaturas elevadas e amenas.....	28
Tabela 2. Taxa de concepção aos 30 dias (TC30) e 60 dias (TC60) de vacas multíparas tratadas ou não com progesterona entre o terceiro e sétimo dia após inseminação artificial em tempo fixo nos períodos de temperaturas elevadas e amenas do ano.....	28
Tabela 3. Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre o índice de temperatura e umidade (ITU) no dia da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a taxa de concepção aos 30 e 60 dias dos grupos controle e tratado com progesterona após a IATF.....	29
Tabela 4. Taxa de mortalidade embrionária e fetal entre 30 e 60 dias de vacas multíparas entre os grupos controle e tratado com progesterona entre o terceiro e sétimo dia após inseminação artificial em tempo fixo nos períodos de temperaturas elevadas e amenas do ano.....	30
Tabela 5. Taxa de concepção aos 30 e 60 dias e taxa de mortalidade embrionária e fetal de vacas multíparas entre os grupos controle e tratado com progesterona entre o terceiro e sétimo dia após inseminação artificial em tempo fixo.....	30
Tabela 6. Média e desvio padrão da concentração de progesterona sérica (ng/mL) no dia 3 (D13) e dia 7 (D17) do ciclo estral, entre os grupos controle e tratado com progesterona após a IATF, de	

	vacas multíparas nos períodos de temperaturas elevadas, temperaturas amenas e durante todo o período experimental.....	32
Tabela 7.	Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre taxa de concepção aos 30 (TC30) e 60 (TC60) dias após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a dosagem de progesterona (P ₄) no dia 3 (D13) e dia 7 (D17) do ciclo estral, dos grupos controle e tratado com progesterona após a IATF.....	33

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

°C	Graus Celsius
CL	Corpo lúteo
D13	Terceiro dia após a inseminação artificial em tempo fixo
D17	Sétimo dia após a inseminação artificial em tempo fixo
E ₂	Estrógeno
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
g	Grama
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IFN- _τ	Interferon-tau
ITU	Índice de temperatura e umidade
LH	Hormônio luteinizante
mg	Miligrama
ng	Nanograma
P ₄	Progesterona
PGF _{2α}	Prostaglandina F2 alfa
T	Temperatura ambiente
TC30	Taxa de concepção aos 30 dias
TC60	Taxa de concepção aos 60 dias
UR	Umidade relativa do ar

RESUMO

O melhoramento genético de vacas leiteiras está associado ao declínio do desempenho reprodutivo. A alta metabolização dos hormônios esteroides traz como consequência a queda de progesterona circulante. Consequentemente, o ambiente uterino e o reconhecimento materno são prejudicados, reduzindo a taxa de concepção. Diante disso, objetivou-se avaliar o efeito do incremento de progesterona circulante, através de implante intravaginal de progesterona, após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas multíparas holandesas, no período de temperaturas elevadas e no período de temperaturas amenas do ano, sobre a taxa de concepção aos 30 e 60 dias após a inseminação e a mortalidade embrionária e fetal. A temperatura ambiente e umidade relativa do ar foram mensuradas diariamente para calcular o índice de temperatura e umidade. Em ambos os períodos foi realizada avaliação ultrassonográfica após o parto e as lactantes aptas foram divididas em dois grupos: multíparas tratadas e multíparas controle. Os animais do grupo tratado receberam um implante de progesterona (1g) no terceiro dia após a IATF, sendo retirado após quatro dias. Amostras de sangue foram coletadas dos grupos controle e tratado no terceiro e sétimo dia após a IATF para análise de progesterona sérica através da técnica de radioimunoensaio. No sétimo dia após a IATF, aferiu-se a temperatura retal dos animais de ambos os grupos. O diagnóstico de prenhez foi realizado aos 30 e 60 dias após a inseminação artificial por tempo fixo através de exame de ultrassom. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2. Foram realizadas análises de variância, utilizando o teste "t" para avaliação das médias. A correlação entre duas variáveis foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson. Avaliou-se a taxa de concepção e a taxa de mortalidade embrionária e fetal pelo teste exato de Fisher. O índice de temperatura e umidade no dia da IATF foi diferente ($P < 0,05$) entre

os períodos avaliados. A taxa de concepção aos 30 e 60 dias e a taxa de mortalidade embrionária e fetal não diferiram entre os grupos tanto no período de temperaturas elevadas quanto no período de temperaturas amenas ($P>0,05$). Durante o período experimental, a concentração de progesterona sérica aumentou no grupo tratado em relação ao grupo controle ($P<0,05$). Conclui-se que o índice de temperatura e umidade no dia da IATF não influenciou a taxa de concepção aos 30 e 60 dias em ambos os grupos avaliados. O implante intravaginal contendo um grama de progesterona, inserido entre o terceiro e sétimo dia após inseminação artificial em tempo fixo, no intuito de elevar a concentração de progesterona sérica, não teve impacto nas taxas de concepção aos 30 e 60 dias e nas taxas de mortalidade embrionária e fetal de vacas holandesas multíparas tanto em períodos de temperaturas elevadas e amenas do ano.

Palavras-chave: taxa de concepção, raça holandesa, hormônios esteroides, taxa de mortalidade embrionária e fetal.

ABSTRACT

Genetic breeding of dairy cows has been associated with decline in reproductive performance. Steroid hormone high metabolism brings as a consequence a fall in circulating progesterone. Consequently, the uterine environment and maternal recognition are damaged, reducing the conception rate. Thus the objective of the present study was to assess the effect of increasing the circulating progesterone by intravaginal progesterone implant after fixed time artificial insemination (FTAI) in multiparous Holstein cows, in the high temperature period and cool temperature periods of the year, on the conception rate at 30 and 60 days after insemination and the embryo and fetal mortality. The environmental temperature and relative air humidity were measured daily to calculate the temperature and humidity index. In both periods ultrasound assessment was made after the birth and the suitable nursing cows were divided into two groups: treated multiparous and control multiparous. The animals in the treated group received a progesterone implant (1g) on the third day after FTAI that was removed after four days. Blood samples were collected from the control and treated groups on the third and seventh day after FTAI to analyze the serum progesterone the radio immune assay technique. On the seventh day after FTAI, the rectal temperature of the animals was measured in both groups. The diagnosis of pregnancy was made at 30 and 60 days after the fixed time artificial insemination by ultrasound exam. A completely randomized block design was used in a 2 x 2 factorial scheme. Analyses of variance were made using the t test to assess the means. The correlation between two variables was made by the Pearson correlation coefficient. The conception, embryonic and fetal mortality rates were assessed by the exact Fisher test. The temperature and humidity index on the day of the FTAI was different ($P < 0.05$) between the periods assessed. The conception rate at 30 and 60 days and the embryonic and fetal mortality

rates did not differ among the groups either in the high temperature period of the or cool temperature period ($P<0.05$). During the experimental period, the serum progesterone concentration increased in the treated group compared to the control group ($P<0.05$). It was concluded that the temperature and humidity index on the day of FTAI did not influence the conception rate at 30 and 60 days in the groups assessed. The vaginal implant containing 1 g progesterone, inserted between the third and seventh day after fixed time artificial insemination to raise the serum progesterone concentration, had no impact on the conception rate at 30 and 60 days and on the embryonic and fetal mortality rates in Holstein multiparous cow in either high or cool temperature periods of the year.

Key words: conception rate, Holstein breed, steroid hormones, embryonic and fetal mortality rate.

1 - INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças, em contínuo crescimento e vem apresentando avanços nos índices de produtividade (Brasil, 2012a).

Além disso, é o quarto produtor mundial de leite (13,6%) com aproximadamente 31,5 bilhões de litros anuais (Brasil, 2012b). Exporta 2% da produção nacional e contribui com 0,9% do total da exportação mundial de leite em pó (USDA, 2011).

De acordo com o relatório de Projeções do Agronegócio de 2010/11 a 2020/21 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a produção de leite deverá crescer a uma taxa anual de 1,9% e as exportações de leite em pó indicam aumento médio anual de 4,6% (Brasil, 2012b).

Nos últimos anos, os programas sociais estimularam a distribuição de renda que provocou expansão da classe C e conseqüentemente aumentou a demanda do mercado interno por produtos de origem animal. No caso do leite, por exemplo, o consumo per capita aumentou de 147 para 170 litros de 2010 para 2011 com projeções para alcançar 180 litros em 2012 (FAEMG, 2012).

Dessa forma, para atender à demanda externa e interna é necessário que o desempenho animal seja otimizado. Uma baixa eficiência reprodutiva determina menor produção de leite e de bezerros, aumento nas despesas de manutenção com vacas secas, maiores taxas de descarte e maior número de doses de sêmen por concepção (Leite et al., 2001).

Os desafios reprodutivos aumentam com o estresse calórico, doenças reprodutivas, nutrição desbalanceada e aumento na produtividade animal. Além disso, estudos relatam que efeitos adversos na mudança de manejo, saúde e condição fisiológica interferem na fertilidade (Mann, 2001).

O decréscimo da eficiência reprodutiva inclui inadequada observação de cio, erro no horário de inseminação, ovulação retardada, balanço energético negativo, mortalidade embrionária e endogamia (Lucy, 2001). Outros fatores relacionados englobam qualidade do sêmen, fertilidade do touro, técnica de inseminação, condição corporal, mastite clínica e subclínica, pododermatites e conforto animal (Wiltbank et al., 2006).

Pesquisas indicam que a taxa de fertilização em vacas é de aproximadamente 90%. Entretanto, a taxa de nascimento médio é de 55%, sendo que a maioria dessa perda (70% a 80%) ocorre entre o dia oito e o dia 16 após a inseminação (Diskin e Morris, 2008). Vacas leiteiras de alta produção têm maior taxa de mortalidade embrionária do que novilhas (Diskin et al., 2006).

O efeito negativo da alta produção de leite na qualidade do oócito, fertilização e início do desenvolvimento embrionário é exacerbado pelo estresse térmico (Hansen e Arechiga, 1999). Oócitos e embriões em estágio inicial são extremamente sensíveis ao estresse calórico. Alta temperatura ambiental reduz a taxa de desenvolvimento embrionário na fase pós-concepção (Ealy et al., 1993).

O mecanismo biológico pelo qual o estresse calórico afeta a produção e a reprodução é parcialmente explicado pela redução na ingestão alimentar, mas também inclui alterações endócrinas, redução na ruminação e absorção de nutrientes e aumento das exigências para manutenção (Baumgard e Rhoads, 2012).

A seleção genética para maior produção de leite é acompanhada pelo decréscimo no desempenho reprodutivo, que pode ser explicado pelo aumento do metabolismo em condições de estresse e demanda de alta energia. Pesquisas têm encontrado associação positiva entre ingestão de matéria seca, fluxo de sangue hepático e taxa de metabolização de progesterona (Sangsritavong et al., 2002).

Em vacas leiteiras, insuficiência luteal e baixa concentração de progesterona são causas de mortalidade embrionária e redução da taxa de prenhez durante o início do desenvolvimento embrionário (Villarroel et al., 2004).

Progesterona pode influenciar a secreção uterina de nutrientes e fatores de crescimento que são essenciais para o início do desenvolvimento embrionário. De acordo com várias pesquisas, suplementação de progesterona durante o início da gestação, melhora a taxa de concepção de vacas leiteiras (Mann e Lamming, 1999).

Altas concentrações de progesterona circulante imediatamente após a concepção são associadas ao alongamento do concepto, juntamente ao aumento da produção de

interferon-tau e maiores taxas de prenhez em vacas (Stronge et al., 2005) e ovelhas (Satterfield et al., 2006). Esse melhor desempenho se deve à redução da mortalidade embrionária na fase crítica do embrião (Howard et al., 2006).

Quanto maior for a eficiência das vacas, menores serão os custos por bezerro nascido e maiores os lucros para o produtor. Para tanto, essa demanda crescente por animais de melhor qualidade, tem alavancado o uso de biotecnologias da reprodução para otimizar o desempenho produtivo e reprodutivo do rebanho, de forma racional e econômica.

1.1. Revisão de literatura

1.1.1. Progesterona

A progesterona (P_4) é um hormônio esteroide, lipossolúvel e derivada do colesterol. A maioria dos hormônios esteroides presentes no sangue está ligada a proteínas como a globulina, uma importante proteína transportadora da progesterona (Swenson e Reece, 1996).

A partir do colesterol circulante, a P_4 é sintetizada no ovário pelo corpo lúteo (CL), placenta e córtex da glândula adrenal. Além dos efeitos hormonais, ela atua como precursora dos estrogênios, androgênios e esteroides do córtex da glândula adrenal (Katzung, 2003).

Apesar da capacidade de passar facilmente da circulação sanguínea pela membrana celular, algumas células são capazes de concentrar e utilizar esteroides por intermédio da síntese de receptores citoplasmáticos específicos. A P_4 plasmática se prende à globulina para ser transportada até a célula-alvo, convertendo o receptor inativo para ativo (Leonhardt e Edwards, 2002).

O complexo esteroide-receptor citoplasmático é transferido ao núcleo, ligando a sítios específicos da cromatina. A síntese de RNA-polimerase prossegue e o RNA mensageiro é sintetizado. Geralmente em 30 minutos após a interação inicial esteroide-receptor citoplasmático, a capacidade celular de sintetizar proteínas é ativada para um objetivo específico (Swenson e Reece, 1996).

A P_4 está associada com o processo da ovulação e o estabelecimento e manutenção da prenhez (Leonardt e Eduards, 2002). Atua com frequência em sinergismo com o estrógeno (E_2) e exerce várias funções no crescimento das glândulas

endometriais e lobuloalveolar da glândula mamária, na atividade secretora do oviduto e das glândulas endometriais para fornecimento de nutrientes para o desenvolvimento do zigoto antes da sua implantação, na inibição da contração uterina durante a gestação e na regulação da secreção de gonadotrofinas (Swenson e Reece, 1996).

1.1.2. Desenvolvimento embrionário

Em ruminantes, diversos estádios do desenvolvimento embrionário inicial são importantes para o crescimento e sobrevivência do embrião, que se move do oviduto para o útero no estágio de oito a 16 células (Grealy et al., 1996). Com cinco a seis dias de idade atinge 16 a 32 células, formando uma esfera compacta denominada mórula. No dia sete ou oito uma cavidade é formada e as células do blastocisto inicial se diferenciam em massa celular interna (embrioblasto), destinada a formar o feto, e em trofoblasto, destinado a formar a placenta (Morris et al., 2001).

Entre os dias nove e 10, o blastocisto expandido eclode da zona pelúcida e continua a expandir antes de começar a alongar por volta do dia 13. O alongamento embrionário ocorre ao redor do momento do reconhecimento materno da gestação e é acompanhado por um aumento na atividade metabólica. A fixação do embrião ao endométrio começa aproximadamente no dia 19 e a implantação embrionária está completa no dia 42 (Thatcher et al., 2001).

1.1.3. Reconhecimento materno da gestação

A expressão “reconhecimento materno da gestação” é o processo pelo qual o concepto sinaliza sua presença à unidade materna, prolongando a vida do CL e mantendo a gestação por uma interação bioquímica que se estabelece entre o concepto e o tecido endometrial nas diversas espécies mamíferas (Spencer e Bazer, 2004).

O estabelecimento da gestação envolve comunicação ativa e passiva entre o embrião e o útero. A manutenção do CL garante a produção continuada de P₄, que é necessária para preparar o endométrio para implantação e nutrição embrionária (Bazer et al., 2008).

Durante o reconhecimento materno da gestação, células mononucleares do trofoblasto do concepto secretam uma proteína denominada interferon-tau (IFN- τ) entre os dias 10 e 21-25 com máxima produção nos dias 14-16 (Spencer et al., 2004b). Essa

proteína também apresenta atividade antiviral, inibe a proliferação celular, regula as células do sistema imune (Ealy et al., 1993) e ativa fatores de transcrição, induzindo a expressão de genes (Binelli et al., 2001).

O IFN- τ produzido se liga a receptores para interferons nas células endometriais (Gray et al., 2006), formando o fator de transcrição que é translocado para o núcleo (Binelli et al., 2001). Essa ação inibe a transcrição de receptores de E₂ e ocitocina no lúmen endometrial e na superfície do epitélio glandular (Spencer et al., 2007a) e a produção de pulsos de prostaglandina F₂ alfa (PGF_{2 α}), prevenindo a luteólise, ou seja, a regressão funcional e estrutural do CL (Spencer et al., 2007b).

O efeito antiluteolítico do IFN- τ mantém a secreção de P₄ que é essencial para a manutenção do ambiente uterino suportar os eventos críticos no sucesso do desenvolvimento do conceito até o parto (Spencer et al., 2004b).

Araújo et al. (2005), estudaram o congelamento de embriões bovinos produzidos *in vitro* e concluíram que após sete dias de cultivo dos blastocistos, houve comprometimento da secreção de IFN- τ dos embriões descongelados, quando comparados com frescos. Em estudo anterior, conduzido por Demmers et al. (2001), o processo de criopreservação provocou lesões no trofoblasto e na massa celular interna, o que prejudicou a qualidade dos embriões, refletindo na sua capacidade de secretar IFN- τ e promover o reconhecimento materno.

Dentre os vários fatores que interferem na comunicação materno-fetal, o principal hormônio que controla o processo de reconhecimento materno é a P₄ (Mann e Lamming, 1999).

Nas espécies animais, os níveis plasmáticos de P₄ variam de acordo com o desenvolvimento, a manutenção e a regressão do corpo lúteo (Hafez e Hafez, 2004).

Mann e Lamming (2001) detectaram que o desenvolvimento embrionário é prejudicado quando há baixa exposição de P₄ após a concepção. Consequentemente, ocorre pouca liberação de IFN- τ e transcrição de receptores de ocitocina no epitélio luminal do endométrio, liberando PGF_{2 α} . Assim, não acontece o reconhecimento materno e a vaca retorna ao cio.

Estudos realizados em vacas por Stronge et al. (2005) e confirmados por Diskin e Morris (2008) detectaram correlação positiva entre a elevada concentração de P₄ pós-concepção até o dia sete e o aumento no alongamento do conceito (Carter et al., 2008).

A suplementação de P₄ durante os dias cinco a nove após a concepção quadruplicou o comprimento do trofoblasto (P<0,01) e aumentou em seis vezes a

concentração uterina de $\text{IFN-}\tau$ ($P < 0,05$) em vacas holandesas não lactantes, quando comparada com a suplementação de P_4 entre o dia 12 e 16, confirmando a importância da P_4 no desenvolvimento embrionário antes do dia 14 (Mann et al., 2006).

Lonergan et al. (2007) observaram que embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* e transferidos em receptoras, a média da área dos embriões recuperados no dia 13 de receptoras com alta progesterona tratadas no dia três do ciclo estral ($3,86 \pm 0,45 \text{ mm}^2$) aumentou, quando comparados com embriões recuperados de receptoras com baixa progesterona ($1,66 \pm 0,38 \text{ mm}^2$).

Estes resultados corroboram com os de Clemente et al. (2009) que, além de observar aumento na área dos embriões *in vitro* recuperados de novilhas previamente tratadas com P_4 no dia três do ciclo estral, detectaram aumento significativo no comprimento no dia 14 ($4,27 \pm 0,42 \text{ mm}$ versus $15,4 \pm 1,61 \text{ mm}$) quando comparados com os embriões recuperados dos animais sem tratamento.

Em contraste, embriões cultivados *in vitro* na presença ou ausência de P_4 , transferidos no dia sete e recuperados no dia 14, não apresentaram alterações na taxa de clivagem ou desenvolvimento embrionário. Similarmente, o número de células do embrioblasto e trofoblasto, assim como as dimensões dos embriões, não foram alteradas. Entretanto, houve uma variação no tamanho dos conceptos recuperados (Clemente et al., 2009).

1.1.4. Progesterona na regulação da expressão gênica no útero

Em todos os modelos animais de implantação embrionária conhecidos, os blastocistos são capazes de transmitir e receber sinais do útero para estabelecer o contato com a mãe (Bazer et al., 2009).

Os fatores primários que estimulam a receptividade endometrial ao conceito são os hormônios esteroides, E_2 e/ou P_4 , que promovem a expressão de seus respectivos receptores. A receptividade do endométrio é causada pela combinação do E_2 e da P_4 , na qual o primeiro causa a proliferação das células, enquanto a combinação de ambos é necessária para a proliferação e diferenciação do estroma celular uterino no intuito de promover a implantação. Mudanças na expressão dos genes induzidas pelos hormônios ovarianos, especialmente P_4 , são críticos para a implantação e manutenção da prenhez (Lee e DeMayo, 2004).

Estudos com remoção de genes são realizados para entender a função do gene uterino e o número dos genes implicados na implantação (Daikoku et al., 2003).

Os receptores de P_4 são expressados no epitélio e no estroma endometrial durante o início da fase luteal, permitindo direta regulação do número de genes através da P_4 , via ativação de seus receptores. Entretanto, a exposição contínua de P_4 no útero por oito a 10 dias causou um decréscimo na regulação da expressão gênica de receptores de P_4 no epitélio luminal e glandular do endométrio após os dias 11 e 13 da prenhez de ovelhas, respectivamente. Porém, na maioria dos úteros das ovelhas do estudo, foi detectada a expressão de receptores de P_4 no estroma e miométrio durante toda a gestação. A perda de receptores de P_4 antes da implantação é comum em ovelhas e vacas (Spencer et al, 2004b).

Há evidências que P_4 e interferons ativam complementarmente as células endometriais para modular a expressão de genes para ligação do trofoblasto ao lúmen uterino e superfície glandular epitelial. Há modificação do fenótipo das células do estroma, inibição de receptores de P_4 e E_2 , supressão de genes para reconhecimento imune do concepto, alterações na permeabilidade de membrana para melhorar a troca de fatores concepto-maternal, aumento da vascularização endometrial e ativação de genes para transporte de nutrientes no lúmen uterino (Bazer et al., 2008).

Em um estudo com novilhas, Forde et al. (2009) observaram que alterações temporais na expressão gênica endometrial ocorreram em diferentes estádios do início da prenhez, sendo que a maior diferença ocorreu entre os dias sete e 13 após a inseminação. A suplementação de P_4 após a inseminação aumentou a expressão de genes endometriais associados com síntese de triglicerídeos e transporte de glicose, que podem ser utilizados como fonte de energia para o desenvolvimento do embrião.

Forde et al. (2011a) observaram em novilhas cíclicas que as alterações temporais na transcrição do endométrio são sensíveis às concentrações de P_4 circulante nos primeiros dias após o estro e que, em condições de baixa concentração progesterônica, o ambiente uterino foi prejudicado, reduzindo a habilidade em suportar o alongamento do concepto.

Forde et al. (2011b) revelaram que as alterações que ocorrem na transcrição endometrial são independentes da presença do concepto até o reconhecimento materno e que diferentes genes são expressados por causa da produção de $IFN-\tau$ pelo concepto.

Clemente et al. (2009) detectaram a presença de RNA mensageiro para receptor de P_4 nos oócitos e em todos os estádios do desenvolvimento embrionário inicial de

vacas, exceto no estágio de mórula. Maior quantidade estava presente nos oócitos imaturos e menor quantidade nos embriões de duas, quatro e 16 células.

O mecanismo de ação pelo qual a progesterona estimula o desenvolvimento embrionário não está bem elucidado, mas evidências indicam que a P₄ induz mudanças na expressão de genes endometriais na condução de alterações na composição das células embrionárias para a sobrevivência e desenvolvimento do conceito (Bazer et al., 2008).

1.1.5. Estratégias para aumentar os níveis de progesterona pós-concepção em vacas

1.1.5.1. Alternativas utilizadas antes da inseminação artificial

Mantovani et al. (2005) observaram que o uso de progesterona intravaginal com PGF_{2α} administrado no início do protocolo de sincronização de receptoras, induziu a formação de um maior folículo pré-ovulatório que resultou em maior corpo lúteo com maior capacidade de produção de progesterona. Entretanto, reduziu a taxa de concepção na transferência de embriões.

Vasconcelos et al. (2000) utilizando injeção de PGF_{2α} dois dias antes da remoção do dispositivo de progesterona em protocolo de IATF, conseguiram aumentar o diâmetro do folículo pré-ovulatório e as concentrações de P₄ após a ovulação, resultando em maiores taxas de prenhez (P<0,05).

De acordo com Bó et al. (2007), a administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG) na retirada do dispositivo de progesterona durante o protocolo de IATF, promove o crescimento e diferenciação final do folículo pré-ovulatório, estimulando a função luteal. Bó et al. (2004) estudaram vacas de corte paridas com baixa condição corporal igual a dois (escala de um a cinco) e detectaram aumento significativo das taxas de prenhez após tratamento com eCG dois dias antes da remoção do dispositivo de progesterona do protocolo de IATF tanto em vacas com CL (55,3% versus 78,8%) quanto naquelas sem CL mas com presença de folículos maiores que oito milímetros de diâmetro (42,6% versus 67,8%). Schneider et al. (2010) não observaram aumento na taxa de prenhez em vacas de corte com boa condição corporal igual a três (escala um a cinco), tratadas ou não com eCG no dia da remoção do dispositivo de progesterona do protocolo de IATF (70,9% versus 80%). Dessa forma, a eficácia do eCG varia de

acordo com a condição corporal, número de dias pós-parto e associação com outras estratégias como desmama temporária (Bó et al., 2007).

1.1.5.2. Alternativas utilizadas após a inseminação artificial

As alternativas utilizadas para aumentar a concentração de P_4 após a inseminação incluem a indução de uma ovulação adicional com desenvolvimento de CL acessório, suplementação direta de P_4 (Stevenson et al., 2007) ou adição de ácidos graxos na dieta (Lopes et al., 2009).

A indução de um CL acessório pela ovulação do folículo da primeira onda pós-inseminação pode ser conseguida através de injeções de gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) ou hormônio luteinizante (LH) após a ovulação (Bridges e Day, 2006).

O tratamento com hCG entre os dias quatro e nove após a inseminação de vacas holandesas lactantes, induziu formação de CL acessório ($P < 0,01$) e aumentou a concentração de P_4 do dia do tratamento até sete dias depois em relação ao grupo controle (Stevenson et al., 2007). Esses resultados corroboram com os de Machado et al. (2008) que trabalharam com vacas nelore tratadas com hCG no dia cinco após a ovulação ($P < 0,01$).

Estudos em vacas de corte, conduzidos por Corrêa et al. (2009) demonstraram que a aplicação de GnRH no dia 5 após a ovulação otimizou a função luteínica através da liberação endógena de LH, aumentando a área do CL ($420 \pm 57 \text{ mm}^2$ versus $382 \pm 57 \text{ mm}^2$), a concentração de P_4 máxima ($6,76 \pm 0,64 \text{ ng/mL}$ versus $5,24 \pm 0,39 \text{ ng/mL}$) e o incremento na secreção de progesterona entre o dia 5 e o final da fase luteínica ($0,62 \pm 0,08 \text{ ng/mL/dia}$ versus $0,37 \pm 0,05 \text{ ng/mL/dia}$).

Novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus* receptoras de embrião tratadas com GnRH, hCG, LH e implante intravaginal contendo 1,9 gramas de progesterona no dia sete do ciclo estral apresentaram maiores taxas de concepção que o grupo controle (53,5%; 51%; 45,4%; 41,1% versus 28,6%). Entretanto, o hCG promoveu maior aumento nas concentrações plasmáticas de P_4 do que os outros tratamentos (Marques et al., 2002).

Mehni et al. (2012) avaliaram os efeitos da administração de P_4 pós-inseminação em vacas Holandesas lactantes e detectaram aumento na concentração plasmática desse hormônio e melhor taxa de prenhez com suplementação de progesterona, via dispositivo intravaginal, nos dias cinco a 19, comparado com injeções de GnRH no dia cinco e 13.

Vacas suplementadas com P₄ nos dias três a seis e meio após a inseminação tiveram correlação positiva com a taxa de sobrevivência embrionária (Beltman et al., 2009). Entretanto, em estudos anteriores, Mann e Lamming (1999), verificaram que o aumento na taxa de prenhez somente ocorre, quando se eleva a P₄ na primeira semana após a inseminação, não tendo efeito, quando a P₄ exógena é suplementada na segunda ou terceira semana após a inseminação. Além disso, a suplementação de P₄ somente poderá beneficiar a fertilidade quando a progesterona é limitada (Bó et al., 2007).

A suplementação de ácidos graxos na dieta de vacas Holandesas lactantes influenciou a qualidade embrionária (Cerri et al., 2009) mas não influenciou o tamanho do CL e a concentração plasmática de P₄ (Childs et al., 2008). Contrastando com estes resultados, Lopes et al. (2009) observaram concentrações menores de progesterona em vacas girolandas não lactantes ovariectomizadas que não receberam ácidos graxos na dieta (1,81 versus 1,66 ng/mL).

Lopes et al. (2009) detectaram taxas de prenhez superiores em vacas Nelore suplementadas com ácidos graxos durante o início do protocolo de sincronização até 28 dias após a IATF (35,5% versus 47,9%). Observaram também um acréscimo de 11,9% na taxa de concepção de receptoras de embrião mestiças que receberam ácidos graxos ao final do protocolo de sincronização até 21 dias após a transferência de embriões em relação ao grupo controle.

1.2. Justificativa e relevância

Diante do exposto, acredita-se que o incremento de progesterona circulante em vacas multíparas da raça Holandesa, através de implante intravaginal, após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) no período de temperaturas elevadas e no período de temperaturas amenas promova um melhor ambiente uterino para o alongamento embrionário e estabelecimento da prenhez, melhorando as taxas de concepção.

1.3. Referências bibliográficas

Araújo, M.C.C., Vale Filho, V.R., Ferreira, A.M., Sá, W.F., Barreto Filho, J.B., Camargo, L.S.A., Serapião, R.V. e Silva, M.V.G.B., 2005. Secreção de interferon-

tau em embriões bovinos produzidos *in vitro* frescos e congelados, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 57 (6), 751-756.

Baumgard, L. e Rhoads, R., 2012. Efeito do estresse calórico no metabolismo e na produção de leite e estratégias para minimizar efeitos negativos. In: XVI Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos, Uberlândia, MG Brasil. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/conapeccjr>>. Acesso em: 22 mar. 2012.

Bazer, F.W., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Spencer, T.E. e Wu, G., 2008. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways, Reproductive Biology, 8 (3), 179-211.

Bazer, F.W., Spencer, T.E., Johnson, G.A. e Burghardt, R.C. e Wu, G., 2009. Comparative aspects of implantation, Reproduction, 138, 195-209.

Beltman, M.E., Lonergan, P., Diskin, J.F., Roche, J.F. e Crowe, M.A., 2009. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers, Theriogenology, 71, 1173-1179.

Binelli, M., Thatcher, W.W., Mattos, R. e Baruselli, P.S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle, Theriogenology, 56, 1451-1463.

Bó, G.A., Cutaia, L., Chesta, P. e Moreno, D., 2004. The use of eCG to increase pregnancy rates in postpartum beef cows following treatment with progesterone vaginal device and estradiol benzoate and fixed-time AI. In: Internacional Embryo Transfer Society Annual Conference, Portland, USA, 1p.

Bó, G.A., Cutaia, L., Peres, L.C., Pincinato, D., Marañá, D. e Baruselli, P.S., 2007. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle, The Society for Reproduction and Fertility, 64, S223-S236.

Brasil, 2012a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Bovinos e Bubalinos. Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 12 abr. 2012a.

Brasil, 2012b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil Projeções do Agronegócio 2010/2011 a 2020/2021. Brasília: MAPA/AGE, 2011. 58 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJEC_OES%20DO%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%202_0.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2012b.

Bridges, G.A. e Day, M.L., 2006. Impacto das concentrações dos hormônios esteróides sobre a fertilidade de bovinos. In: X Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos, Uberlândia, MG Brasil, 175-191.

Carter, F., Forde, N., Duffy, P., Wade, M., Fair, T., Crowe, M.A., Evans, A.C.O., Kenny, D.A., Roche, J.F. e Lonergan, P., 2008. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers, *Reproduction, Fertility and Development*, 20 (3), 368-375.

Cerri, R.L.A., Juchem, S.O., Chebel, R.C., Rutigliano, H., Bruno, R.G.S., Galvão, K.N., Thatcher, W.W. e Santos, J.E.P., 2009. Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in highproducing dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 92, 1520-1531.

Childs, S., Lynch, C.O., Hennessy, A.A., Stanton, C., Wathes, D.C., Sreenan, J.M., Diskin, M.G., Kenny, D.A., 2008. Effect of dietary enrichment with either n-3 or n-6 fatty acids on systemic metabolite and hormone concentration and ovarian function in heifers, *Animal*, 2, 883-893.

Clemente, M., La Fuente, J., Naib, A.A., Gutierrez-Adan, A., Roche, J.F., Rizos, D. e Lonergan, P., 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium?, *Reproduction*, 138, 507-517.

- Corrêa, R.F., Bergamaschi, M.A.C.M. e Machado, R., 2009. Suporte hormonal com GnRH após a ovulação em vacas de corte. In: I Jornada Científica – Embrapa de São Carlos, SP Brasil, pp. 37.
- Daikoku, T., Matsumoto, H., Gupta, R.A., Das, S.K., Gassmann, M., Dubois, R.N. e Dey, S.K., 2003. Expression of hypoxia-inducible factors in the peri-implantation mouse uterus is regulated in a cell-specific and ovarian steroid hormone-dependent manner. Evidence for differential function of HIFs during early pregnancy, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 7683-7691.
- Demmers, K.J., Derecka, K. e Flint, A., 2001. Trophoblast interferon and pregnancy, *Reproduction*, 121, 41-49.
- Diskin, M.G. e Morris, D.G., 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants, *Reproduction in Domestic Animals*, 43 (suppl. 2), 260-267.
- Diskin, M.G., Murphy, J.J. e Sreenan, J.M., 2006. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions, *Animal Reproduction Science*, 96 (3-4), 297-311.
- Dunlap, K.A., Erikson, D.W., Burghardt, R.C., White, F.J., Reed, K.M., Farmer, J.L., Spencer, T.E., Magness, R.R., Bazer, F.W., Bayless, K.J. e Johnson, G.A., 2008. Progesterone and placentation increase secreted phosphoprotein one (SPP1 or osteopontin) in uterine glands and stroma for histotrophic and hematotrophic support of ovine pregnancy, *Biology of Reproduction*, 79, 983-990.
- Ealy, A.D., Drost, M. e Hansen, P.J., 1993. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows, *Journal of Dairy Science*, 76 (10), 2899-2905.
- FAEMG, 2012. Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de Minas Gerais. Disponível em: <http://www.faemg.org.br/News.aspx?Code=21948&ParentPath=News&ContentVersion=R>. Acesso em: 11 de mai. 2012.

- Forde, N., Beltman, M.E., Duffy, G.B., Metha, J.P., O'Gaora, P., Roche, J.F., Lonergan, P. e Crowe, M.A., 2011a. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation, *Biology of Reproduction*, 84 (2), 266-278.
- 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. e Roche, J.F., 2009. Progesterone-Regulated Changes in Endometrial Gene Expression Contribute to Advanced Conceptus Development in Cattle, *Biology of Reproduction*, 81, 784-794.
- Forde, N., Carter, F., Spencer, T.E., Bazer, F.W., Sandra, O., Mansouri-Attia, N., Okumu, L.A., Mcgettigan, P.A., Metha, J.P., McBride, R., O'Gaora, P., Roche, J.F. e Lonergan, P., 2011b. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant?, *Biology of Reproduction*, 85 (1), 144-156.
- Gray, C.A., Abbey, C.A., Beremand, P.D., Choi, Y., Farmer, J.L., Adelson, D.L., Thomas, T.L., Bazer, F.W. e Spencer, T.E., 2006. Identification of endometrial genes regulated by early pregnancy, progesterone, and interferon-tau in the ovine uterus, *Biology of Reproduction*, 74, 383-394.
- Grealy, M., Diskin, M.G. e Sreenan, J.M., 1996. Protein content of cattle oocytes and embryos from the two-cell to the elongated blastocyst stage at day 16, *Journal of Reproduction and Fertility*, 107, 229-233.
- Hafez, B. e Hafez, E.S.E., 2004. *Reprodução Animal*, sétima ed. (Manole, São Paulo).
- Hansen, P.J. e Arechiga, C.F., 1999. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow, *Journal of Animal Science*, 77 (suppl. 2), 36-50.
- Howard, J.M., Manzo, R., Dalton, J.C., Frago, F. e Ahmadzadeh, A., 2006. Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered

gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination, *Animal Reproduction Science*, 95 (3-4), 224-233.

Katzung, B.G., 2003. *Farmacologia Básica & Clínica*, oitava ed. (Guanabara Koogan, Rio de Janeiro).

Lee, K.Y. e Demayo, F.J., 2004. Animal models of implantation, *Reproduction*, 128, 679-695.

Leite, T.E., Moraes, J.C.F. e Pimentel, C.A., 2001. Eficiência produtiva e reprodutiva em vacas leiteiras, *Ciência Rural*, 31 (3), 467-472.

Leonhardt, S.A. e Edwards, D.P., 2002. Mechanism of action of progesterone antagonists, *Experimental Biology and Medicine*, 227, 969-980.

Lonergan P., Woods, A., Fair, T., Carter, F., Rizos, D., Ward, F., Quinn, K. e Evans, A., 2007. Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle, *Reproduction, Fertility and Development*, 19 (7), 861-869.

Lopes, C.N., Scarpa, A.B., Cappellozza, B.I., Cooke, R.F. e Vasconcelos, J.L.M., 2009. Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of *Bos indicus* beef cows, *Journal of Animal Science*, 87, 3935-3943.

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

Mann, G.E., 2001. Pregnancy rates during experimentation in dairy cows, *The Veterinary Journal*, 161 (3), 301-305.

Mann, G.E., Fray, M.D. e Lamming, G.E., 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow, *The Veterinary Journal*, 171 (3), 500-503.

- Mann, G.E. e Lamming, G.E., 1999. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle, *Reproduction in Domestic Animals*, 34, 269-274.
- Mann, G.E. e Lamming, G.E., 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows, *Reproduction*, 121, 175-180.
- Mantovani, A.P., Reis, E.L., Gacek, F., Bó, G.A., Baruselli, P.S. e Binelli, M., 2005. Prolonged use of a progesterone-releasing intravaginal device (CIDR) for induction of persistent follicles in bovine embryo recipients, *Animal Reproduction Science*, 2, 272-277.
- Marques, M.O., Madureira, E.H., Bó, G.A. e Baruselli, P.S., 2002. Ovarian ultrasonography and plasma progesterone concentration in *Bos taurus* x *Bos indicus* heifers administered different treatments on day 7 of the estrous cycle, *Theriogenology*, 57 (1), 548.
- Mehni, S.B., Shabankareh, H.K., Kazemi-Bonchenari, M. e Eghbali, M., 2012. The comparison of treating Holstein dairy cows with progesterone, CIDR and GnRH after insemination on serum progesterone and pregnancy rates, *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (1), 131-134.
- Morris, D.G., Grealy, M., Leese, H.J., Diskin, M.G. e Sreenan, J.M., 2001. Cattle embryo growth, development and viability, *Beef Production Series*, 36, ISBN N. 1 84170224 2, Ballsbridge.
- Sangsrivavong, S., Combs, D.K., Sartori, R. e Wiltbank, M.C., 2002. High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle, *Journal of Dairy Science*, 85, 2831-2842.
- Satterfield, M.C., Bazer, F.W. e Spencer, T.E., 2006. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus, *Biology of Reproduction*, 75, 289-296.

- Schneider, A., Pfifer, L.F.M., Schmitt, E., Bianchi, I., Vieira, M.B., Xavier, E.G., Del Pino, F.A.B. e Corrêa, M.N., 2010. The use of insulin to improve fertility of timed-inseminated postpartum suckled beef cows, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45 (10), 1219-1221.
- Spencer, T.E. e Bazer, F.W., 2004. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals, *Journal of Animal Science*, 82, E4-E13.
- Spencer, T.E., Johnson, G.A., Bazer, F.W. e Burghardt, R.C., 2007a. Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants, *Reproduction in Domestic Ruminants*, 6 (1), 379-396.
- Spencer, T.E., Johnson, G.A., Bazer, F.W. e Burghardt, R.C., 2004a. Implantation mechanisms: insights from the sheep, *Reproduction*, 128, 657-668.
- Spencer, T.E., Johnson, G.A., Bazer, F.W., Burghardt, R.C. e Palmarini, M., 2007b. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses, *Reproduction, Fertility and Development*, 19 (1), 65-78.
- Spencer, T.E., Johnson, G.A., Burghardt, R.C. e Bazer, F.W., 2004b. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals, *Biology of Reproduction*, 71, 2-10.
- Stevenson, J.S., Portaluppi, M.A., Tenhouse, D.E., Lloyd, A., Eborn, D.R., Kakuba, S. e Dejarnette, J.M., 2007. Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropic-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone, *Journal of Dairy Science*, 90, 331-340.
- Stronge, A.J., Sreenan, J.M., Diskin, M.G., Mee, J.F., Kenny, D.A. e Morris, D.G., 2005. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows, *Theriogenology*, 64, 1212-1224.

- Swenson, M.J. e Reece, W.O., 1996. Dukes - Fisiologia dos animais domésticos, décima primeira ed. (Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro).
- Thatcher, W.W., Guzeloglu, A., Mattos, R., Binelli, M., Hansen, T.R. e Pru, J.K., 2001. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle, *Theriogenology*, 56 (9), 1435-1450.
- USDA, 2011. United States Department of Agriculture. Disponível em: <http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2011.
- Vasconcelos, J.L.M., Araujo, T.P.B., Cerri, R.L.A., Valarelli, R.L. e Wechsler, F.S., 2000. Ovulation and synchronization rates in Holstein and crossbred lactating dairy cows when receiving the PGF 2α injection on d 6 or 7 of the Ovsynch protocol, *Journal of Dairy Science*, 83 (suppl.), 214.
- Villarroel, A., Martino, A., Bondurante, H.R., Deletang, F. e Sischo, M.W., 2004. Effect of post-insemination supplementation with PRID on pregnancy in repeat-breeder Holstein cows, *Theriogenology*, 61, 1513-1520.
- Wiltbank, M.C., Weigel, K.A., Caraviello, D.Z. e Souza, A., 2006. Factors affecting reproductive in U.S. dairy herds. In: X Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos, Uberlândia, MG Brasil, pp. 3-9.

2 - OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito do incremento de progesterona circulante, através de dispositivo intravaginal de progesterona, após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas multíparas da raça Holandesa, no período de temperaturas elevadas e no período de temperaturas amenas do ano, sobre a taxa de concepção aos 30 e 60 dias, a taxa de mortalidade embrionária e fetal e a concentração de progesterona sérica.

Os objetivos específicos são:

1. Comparar o índice de temperatura e umidade no dia da IATF entre os períodos de temperaturas elevadas (janeiro a abril de 2012) e temperaturas amenas do ano (maio a agosto de 2012);
2. Correlacionar o índice de temperatura e umidade no dia da IATF com a taxa de concepção aos 30 e 60 dias durante todo o período experimental (janeiro a agosto de 2012);
3. Avaliar a taxa de concepção aos 30 e 60 dias após a IATF, das vacas multíparas que receberam dispositivo intravaginal de progesterona após a IATF nos períodos de temperatura elevadas do ano (janeiro, fevereiro, março e abril de 2012) e nos períodos de temperatura amenas do ano (maio, junho, julho e agosto de 2012);
4. Comparar as taxas de concepção aos 30 e 60 dias após a IATF, dos grupos de multíparas tratado e controle entre as diferentes épocas do ano e durante todo o período avaliado (janeiro a agosto de 2012);
5. Comparar a taxa de mortalidade embrionária e fetal entre os grupos de multíparas, tratado e controle em diferentes épocas do ano e durante todo o período avaliado (janeiro a agosto de 2012);

6. Comparar os níveis séricos de progesterona após a IATF entre os grupos de multíparas tratado e controle nos dois períodos avaliados e durante todo o período experimental (janeiro a agosto de 2012);

7. Correlacionar os níveis séricos de progesterona após a IATF com a taxa de concepção aos 30 e 60 dias, durante todo o período experimental (janeiro a agosto de 2012).

3-TRABALHO CIENTÍFICO

PROGESTERONA PÓS-INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E DESEMPENHO REPRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS

Resumo

Avaliou-se o efeito do incremento de progesterona circulante, através de implante intravaginal de progesterona entre o terceiro e sétimo dia após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas multíparas holandesas, no período de temperaturas elevadas e no período de temperaturas amenas do ano sobre a taxa de concepção aos 30 e 60 dias após a IATF e a taxa de mortalidade embrionária e fetal. O diagnóstico de prenhez foi realizado aos 30 e 60 dias após a IATF através de exame de ultrassom. O índice de temperatura e umidade no dia da IATF foi diferente ($P < 0,05$) entre os períodos avaliados. A taxa de concepção aos 30 e 60 dias e a taxa de mortalidade embrionária e fetal não diferiram entre os grupos tanto no período de temperaturas elevadas quanto no período de temperaturas amenas ($P > 0,05$). Durante todo período experimental, a concentração de progesterona sérica foi maior no grupo tratado em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Conclui-se que o índice de temperatura e umidade no dia da IATF não influenciou a taxa de concepção aos 30 e 60 dias em ambos os grupos avaliados. O implante intravaginal contendo um grama de progesterona, inserido entre o terceiro e sétimo dia após inseminação artificial em tempo fixo, no intuito de elevar a concentração de progesterona sérica, não teve impacto nas taxas de concepção aos 30 e 60 dias e nas taxas de mortalidade embrionária e fetal de vacas holandesas multíparas, tanto em períodos de temperaturas elevadas e amenas do ano.

Palavras-chave: Taxa de concepção · Raça holandesa · Hormônios esteroides · Taxa de mortalidade embrionária e fetal

Abreviações

°C	Graus Celsius
D13	Terceiro dia após a inseminação artificial em tempo fixo
D17	Sétimo dia após a inseminação artificial em tempo fixo
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
G	Gramas
ITU	Índice de temperatura e umidade
Mg	Miligramas
Ng	Nanogramas
P ₄	Progesterona
PGF _{2α}	Prostaglandina F2 alfa
T	Temperatura ambiente
TC30	Taxa de concepção aos 30 dias
TC60	Taxa de concepção aos 60 dias
UR	Umidade relativa do ar

Introdução

A seleção genética para maior produção de leite é acompanhada pelo decréscimo no desempenho reprodutivo, que pode ser explicado pelo aumento do metabolismo em condições de estresse e demanda de alta energia. Pesquisas têm encontrado associação positiva entre ingestão de matéria seca, fluxo de sangue hepático e taxa de metabolização de progesterona (Sangsritavong et al., 2002).

Pesquisas indicam que a taxa de fertilização em vacas é de aproximadamente 90%. Entretanto, a taxa de nascimento médio é de 55%, sendo que a maioria dessa perda (70% a 80%) ocorre entre o dia oito e o dia 16 após a inseminação (Diskin e Morris, 2008).

O efeito negativo da alta produção de leite na qualidade do oócito, fertilização e início do desenvolvimento embrionário são exacerbados pelo estresse térmico (Hansen e Arechiga, 1999). Oócitos e embriões em estágio inicial são extremamente sensíveis ao

estresse calórico. Alta temperatura ambiente reduz a taxa de desenvolvimento embrionário na fase pós-concepção (Ealy et al., 1993).

O mecanismo biológico pelo qual o estresse calórico afeta a produção e a reprodução é parcialmente explicado pela redução na ingestão alimentar, mas também inclui alterações endócrinas, redução na ruminação e absorção de nutrientes e aumento das exigências para manutenção (Baumgard e Rhoads, 2012).

Em vacas leiteiras, insuficiência luteal e baixa concentração de progesterona são causas de mortalidade embrionária e redução da taxa de prenhez durante o início do desenvolvimento embrionário (Villarroel et al., 2004).

Progesterona pode influenciar a secreção uterina de nutrientes e fatores de crescimento que são essenciais para o início do desenvolvimento embrionário (Mann e Lamming, 1999).

Altas concentrações de progesterona circulante imediatamente após a concepção são associadas ao alongamento do conceito juntamente ao aumento da produção de interferon-tau e maiores taxas de prenhez em vacas (Stronge et al., 2005) e ovelhas (Satterfield et al., 2006). Esse melhor desempenho se deve à redução da mortalidade embrionária na fase crítica do embrião (Howard et al., 2006).

Diante disso, objetivou-se avaliar o efeito do incremento de progesterona circulante, através de implante intravaginal de progesterona, após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas multíparas holandesas, no período de temperaturas elevadas e no período de temperaturas amenas do ano, sobre a taxa de concepção aos 30 e 60 dias após a inseminação e a mortalidade embrionária e fetal.

Material e Métodos

Local do experimento

O experimento foi realizado em uma granja leiteira, localizada em Montividiu, Goiás, Brasil (latitude 17°20'5,7" e longitude 51°18'46,7"), constituída por 1058 bovinos, 390 lactantes, peso médio corporal de 510 quilos e produção média anual de 21,4 litros de leite por vaca por dia. Os animais experimentais ficaram em confinamentos arborizados e abastecidos por bebedouros de água. Receberam dieta total de 54% de forragem (silagem de milho) e 46% de concentrado (milho, soja e núcleo comercial com traços minerais e vitaminas) contendo 16,1% de proteína bruta e 70,2%

de NDT (base na matéria seca) de acordo com as recomendações do NRC (1989), distribuída quatro vezes ao dia através de um vagão total mix.

Condução do experimento

O estudo foi executado com 119 vacas holandesas, categoria multíparas com produção média de $28,87 \pm 1,30$ litros de leite/dia e $58,69 \pm 8,80$ dias em lactação, nos períodos de temperaturas elevadas e amenas do ano, com início em janeiro de 2012 e término em agosto de 2012.

Durante o período experimental, aferiu-se a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar diariamente. No período de temperaturas elevadas (janeiro a abril de 2012), a temperatura média foi $22,8 \pm 0,7^\circ\text{C}$, máxima de $25,3 \pm 0,6^\circ\text{C}$, mínima de $20,1 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e umidade relativa média de $78 \pm 2\%$. No período de temperaturas amenas do ano (maio a agosto de 2012), a temperatura média foi $21,2 \pm 1,3^\circ\text{C}$, máxima de $23,6 \pm 1,3^\circ\text{C}$, mínima de $18,9 \pm 1,5^\circ\text{C}$ e umidade relativa média de $63 \pm 14\%$.

Para indicar o nível de estresse térmico dos animais do experimento, calculou-se o índice de temperatura e umidade (ITU) no dia da IATF, a partir do modelo definido por Thom (1959) e utilizado por Maturana Filho et al. (2011): $\text{ITU} = 0,8 \times T + [(\text{UR}(\%)/100) \times (T-14,4)] + 46,4$, na qual: T = temperatura ambiente em $^\circ\text{C}$ e UR = umidade relativa do ar, aferidos através de um termo-higrômetro digital (Instrutemp®, Belenzinho, SP, Brasil). Essa fórmula geral foi utilizada porque os animais não eram homogêneos quanto a pelagem. O ITU médio e desvio padrão foi de $65,14 \pm 0,16$ para o período de temperaturas elevadas e $63,11 \pm 0,25$ para o período de temperaturas amenas.

Avaliação e preparação dos animais

Quinzenalmente, após o parto, foi realizada avaliação ultrassonográfica e somente as lactantes multíparas com escore de condição corporal médio de 3 (escala 1 a 5, sendo 1 muito magra e 5 muito gorda, segundo Ferguson et al., 1994) e com 45 a 80 dias de lactação que estavam com útero e ovários aptos, participaram do experimento.

O protocolo hormonal usado para a IATF foi adaptado ao utilizado por Ranieri et al. (2011). No dia zero (D0) as lactantes aptas receberam um dispositivo intravaginal (Cronipres®, Biogénesis-Bagó, Garin, província de Buenos Aires, Argentina) e 2 mg de benzoato de estradiol (Bioestrogen®, Biogénesis-Bagó, Garin, província de Buenos

Aires, Argentina). Após oito dias (D8), o dispositivo foi retirado e aplicado 0,15 mg de cloprostenol sódico (Croniben[®], Biogénesis-Bagó, Garin, província de Buenos Aires, Argentina), 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (Folligon[®], Intervet International B.V., Boxmeer, Holland) e 1 mg de cipionato de estradiol (ECP[®], Pfizer, Pharmacia and Upjohn Company, NY, USA). Decorridas 48 horas (D10), os animais receberam 0,004 mg de acetato de buserelina (Sincroforte[®], Ouro Fino, Cravinhos, SP, Brasil) e foram inseminados.

Durante o período de temperaturas elevadas foram realizadas 49 inseminações, sendo 23 do grupo controle (duas em janeiro, sete em fevereiro, nove em março e cinco em abril) e 26 do grupo tratado (cinco em janeiro, nove em fevereiro, sete em março e cinco em abril). No período de temperaturas amenas, foram realizadas 70 inseminações, distribuídas igualmente entre o grupo controle (sete em maio, cinco em junho, 11 em julho e 12 em agosto) e o grupo tratado (sete em maio, sete em junho, dez em julho e 11 em agosto).

Grupos experimentais

No período de temperaturas elevadas, nos meses de janeiro a abril de 2012, foram trabalhados os seguintes grupos: Grupo de Multíparas Tratadas (n=26) - Vacas multíparas que receberam um dispositivo intravaginal contendo um grama de progesterona três dias após a IATF (D13) e retirado no sétimo dia após a IATF (D17) e Grupo de Multíparas Controle (n=23) - Vacas multíparas inseminadas por IATF.

No período de temperaturas amenas, nos meses de maio a agosto de 2012, foram trabalhados os seguintes grupos: Grupo de Multíparas Tratadas (n=35) - Vacas multíparas que receberam um dispositivo intravaginal contendo um grama de progesterona três dias após a IATF (D13) e retirado no sétimo dia após a IATF (D17) e Grupo de Multíparas Controle (n=35) - Vacas multíparas inseminadas por IATF.

Nos grupos de vacas multíparas tratadas foram utilizados dispositivos intravaginais contendo um grama de progesterona, sendo inseridos três dias após a IATF e retirados após sete dias da IATF.

Em ambos os grupos de multíparas avaliados, sete dias após a IATF, aferiu-se a temperatura retal com termômetro digital, que de acordo com Ealy et al. (1993), o estresse térmico pelo calor afeta o desenvolvimento inicial do embrião até o dia 7-8.

Coleta das amostras de sangue e dosagem de progesterona sérica

No terceiro (D13) e sétimo (D17) dia após a IATF foram coletadas amostras de sangue dos grupos tratado e controle, via veia coccígea, utilizando tubos de coleta de sangue tipo vacutainer de 9 mL e agulhas de vacutainer 25 x 8 mm (21G). As amostras de sangue foram mantidas refrigeradas por 12 a 24 horas até a centrifugação a 2000 rpm por 20 minutos. O soro foi pipetado, acondicionado em tubos tipo eppendorffs e armazenado a -20°C. As análises de concentração de progesterona sérica foram realizadas pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, localizado em Piracicaba - SP, por meio da técnica de radioimunoensaio, utilizando kit comercial (Coat-A-Count, Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, CA, USA) em um único ensaio com coeficiente de variação intraensaio de 5,6% e sensibilidade de 0,02 ng/mL.

No período de temperaturas amenas, houve perda de cinco amostras de soro sanguíneo, sendo três do grupo controle e dois do grupo tratado.

Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 30 e 60 dias após a IATF por meio de exame de ultrassom com transdutor linear de 5.0 MHz (Mindray®, DP3300).

Delineamento estatístico

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x2, sendo dois tratamentos (tratadas e controle) e duas épocas de tratamento (temperaturas elevadas e amenas). As informações foram trabalhadas de modo a se obter um conjunto de dados estruturados, que permitisse o início das análises preliminares.

As análises de crítica e consistência dos dados foram realizadas por meio do procedimento UNIVARIATE (SAS, 2000), para determinar se os erros experimentais das variáveis possuíam distribuição normal de probabilidade e homogeneidade de variância.

Foram realizadas análises de variância utilizando o método dos quadrados mínimos por meio do procedimento GLM (SAS, 2000). As médias ajustadas foram

obtidas através da opção LSMEANS do procedimento GLM. Para estas análises usando o modelo, cuja equação é:

$$Y_{ij} = \mu + Tr_i + e_{ij}$$

na qual:

Y_{ij} é a observação do animal j , pertencente ao i -ésimo tratamento;

μ é a média geral de todas as observações;

Tr_i é o efeito fixo do i -ésimo tratamento;

e_{ij} é o erro aleatório associado a cada observação ij , pressuposto normalmente distribuído e independente com média zero e variância σ^2 .

A produção de leite na data do início do protocolo foi incluída no modelo como covariável.

O teste de média “t” também foi obtido por meio da opção LSMEANS do procedimento GLM do pacote computacional referido anteriormente. Para o estudo da intensidade com que se manifesta uma associação entre duas variáveis, optou-se pelo uso do coeficiente de correlação de Pearson, obtido pelo procedimento CORR (SAS, 2000).

A frequência de animais gestantes ou não, por grupo experimental, foi submetida ao estudo de dispersão de frequência com o uso do teste exato de Fisher, por meio do procedimento FREQ (SAS, 2000).

Resultados e discussão

O ITU calculado no dia da IATF se apresentou maior ($P < 0,01$) no período de temperaturas elevadas do que no período de temperaturas amenas, tanto para o grupo controle ($64,98 \pm 0,79$ versus $63,19 \pm 1,44$) quanto para o grupo tratado ($65,31 \pm 0,77$ versus $63,02 \pm 1,48$). Entretanto, não foi verificada diferença ($P > 0,05$) entre o grupo controle e tratado no período de temperaturas elevadas ($64,98 \pm 0,79$ versus $65,31 \pm 0,77$) e no período de temperaturas amenas ($63,19 \pm 1,44$ versus $63,02 \pm 1,48$), como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 Média e desvio padrão do índice de temperatura e umidade (ITU) no dia da inseminação artificial em tempo fixo entre os períodos de temperaturas elevadas e amenas.

Grupo	Temperaturas elevadas		Temperaturas amenas	
	n	ITU	n	ITU
Controle	23	64,98 ± 0,79 aA	35	63,19 ± 1,44 bA
Tratado	26	65,31 ± 0,77 aA	35	63,02 ± 1,48 bA

Valores indicados com letras minúsculas diferentes nas linhas e diferem entre si entre os períodos ($P < 0,01$) e aqueles com letras maiúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre os grupos ($P > 0,05$).

A taxa de concepção aos 30 dias não diferiu entre os grupos controle e tratado no período de temperaturas elevadas (43,48% versus 42,31%, $P > 0,05$) e no período de temperaturas amenas (40,00% versus 34,29%, $P > 0,05$). Também não se observou diferença entre os períodos de temperaturas elevadas e amenas do grupo controle (43,48% versus 40,00%, $P > 0,05$) e tratado (42,31% versus 34,29%, $P > 0,05$). A taxa de concepção aos 60 dias não diferiu entre os grupos controle e tratado no período de temperaturas elevadas (34,78% versus 34,62%, $P > 0,05$) e no período de temperaturas amenas (40,00% versus 28,57%, $P > 0,05$). Também não foi verificada diferença entre os períodos de temperaturas elevadas e amenas do grupo controle (34,78% versus 40,00%, $P > 0,05$) e tratado (34,62% versus 28,57%, $P > 0,05$), como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 Taxa de concepção aos 30 dias (TC30) e aos 60 dias (TC60) de vacas multíparas tratadas ou não com progesterona entre o terceiro e sétimo dia após inseminação artificial em tempo fixo nos períodos de temperaturas elevadas e amenas do ano.

Grupo	Temperaturas elevadas			Temperaturas amenas		
	n	TC30	TC60	n	TC30	TC60
Controle	23	43,48% aA	34,78% aA	35	40,00% aA	40,00% aA
Tratado	26	42,31% aA	34,62% aA	35	34,29% aA	28,57% aA

Valores indicados com letras minúsculas iguais nas linhas não diferem entre si entre os períodos ($P < 0,01$) e aqueles com letras maiúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre os grupos ($P > 0,05$).

De acordo com Sartori et al. (2002), a taxa de fertilização de vacas holandesas é menor no verão do que no inverno (55,3% versus 87,8%). Ryan et al. (1993) observaram uma taxa de concepção superior de vacas inseminadas no inverno quando comparadas com vacas inseminadas durante o verão (36% versus 21%). Resultados semelhantes foram descritos por Villa-Mancera et al. (2011), em um estudo realizado com vacas leiteiras, em que a taxa de concepção foi maior ($P < 0,01$) durante o inverno

(36,9%) do que no verão (32,1%).

Entretanto, neste estudo, não houve influência do período do ano nas taxas de concepção aos 30 e 60 dias após a IATF em nenhum dos grupos avaliados, mesmo existindo uma diferença significativa no ITU calculado no dia da IATF entre o período de temperaturas elevadas e amenas do grupo controle ($64,98 \pm 0,79$ versus $63,19 \pm 1,44$) e do grupo tratado ($65,31 \pm 0,77$ versus $63,02 \pm 1,48$), como pode ser observado na Tabela 1. Este fato pode ser explicado pelos valores de ITU dos dois grupos avaliados, em ambos os períodos, sendo inferiores ou muito próximos a 65 e de acordo com Wheelock et al. (2010), estão dentro do limite de conforto térmico para vacas leiteiras.

Como pode ser observado na Tabela 3, não houve correlação entre o índice de temperatura e umidade no dia da IATF e a taxa de concepção aos 30 e 60 dias durante o período experimental ($P > 0,05$).

Tabela 3 Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre o índice de temperatura e umidade (ITU) no dia da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a taxa de concepção aos 30 e 60 dias dos grupos controle e tratado com progesterona após a IATF.

	n	R	Valor de P
Taxa de concepção aos 30 dias	119	0,0862	0,1754
Taxa de concepção aos 60 dias	119	0,0608	0,2556

Ravagnolo e Misztal (2002) reportaram que a reprodução de vacas leiteiras holandesas foi negativamente influenciada quando a média diária de ITU foi maior que 70 na Geórgia e Flórida. Além disso, verificaram que o ITU no dia da inseminação mostrou maior efeito na reprodução do que ITU após 10, 20 e 30 dias da inseminação. Porém, neste estudo não foi observada correlação entre ITU no dia da IATF e a taxa de concepção aos 30 e 60 dias.

No sétimo dia após a IATF, a temperatura retal média das vacas no período de temperaturas elevadas do grupo controle e tratado foi $38,93 \pm 0,61^\circ\text{C}$ e $38,88 \pm 0,53^\circ\text{C}$, respectivamente. No período de temperaturas amenas, foi de $38,25 \pm 0,57^\circ\text{C}$ para o grupo controle e $38,39 \pm 0,57^\circ\text{C}$ para o grupo tratado.

De acordo com a tabela de ITU revisada para vacas leiteiras em lactação proposta por Smith et al. (2012), o ITU deste estudo foi igual 71, indicando limiar de estresse, com frequência cardíaca acima de 60, temperatura retal acima de $38,5^\circ\text{C}$, início da redução do rendimento leiteiro e detecção de problemas reprodutivos.

A taxa de mortalidade embrionária e fetal entre 30 e 60 dias após a IATF no período de temperaturas elevadas no grupo controle e tratado foi de 8,70% e 7,69%, respectivamente ($P>0,05$). No período de temperaturas amenas, não houve mortalidade embrionária e fetal entre 30 e 60 dias para o grupo controle, mas no grupo tratado foi de 5,71% ($P>0,05$), como pode ser visualizado na Tabela 4.

Tabela 4 Taxa de mortalidade embrionária e fetal entre 30 e 60 dias de vacas multíparas entre os grupos controle e tratado com progesterona entre o terceiro e sétimo dia após inseminação artificial em tempo fixo nos períodos de temperaturas elevadas e amenas do ano.

Grupo	Temperaturas elevadas		Temperaturas amenas	
	n	Taxa de mortalidade embrionária e fetal	n	Taxa de mortalidade embrionária e fetal
Controle	23	8,70% A	35	0,00% A
Tratado	26	7,69% A	35	5,71% A

Valores indicados com letras maiúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente ($P>0,05$).

Ao analisar os dados entre janeiro a agosto de 2012, não foi observada diferença significativa na taxa de concepção aos 30 dias entre os grupos avaliados ($P>0,05$). Porém, a taxa de concepção aos 60 dias apresentou tendência em ser menor para o grupo tratado ($P=0,0785$) em relação ao grupo controle, mas não houve aumento na mortalidade embrionária e fetal entre os 30 e 60 dias ($P>0,05$), como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 Taxa de concepção aos 30 e 60 dias e taxa de mortalidade embrionária e fetal de vacas multíparas entre os grupos controle e tratado com progesterona entre o terceiro e sétimo dia após inseminação artificial em tempo fixo.

Grupo	n	Taxa de concepção		Taxa de mortalidade embrionária e fetal
		30 dias	60 dias	
Controle	58	41,38% A	37,93% A	8,33% A
Tratado	61	37,70% A	31,15% A	17,39% A

Valores indicados com letras maiúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente ($P>0,05$).

Semelhante aos resultados obtidos neste trabalho, Pandey et al. (2012) não observaram diferença na taxa de concepção de búfalas que foram suplementadas com 3 mg do progestágeno norgestomet entre os dias 4 e 10 após a inseminação artificial, em relação ao grupo não tratado ($P>0,05$). Osman e Erol (2011) não observaram melhora na taxa de concepção de vacas repetidoras de cio tratadas com implante intravaginal contendo 1,55 gramas de progesterona entre o dia 4 e 11 após a inseminação, assim

como o tratamento entre os dias 11 e 18. Da mesma forma, Arndt et al. (2009), não observaram diferença na taxa de concepção, na taxa de mortalidade embrionária e na concentração de progesterona sérica quando inseriu dispositivo contendo 1,38 gramas de progesterona entre os dias 4 e 18 após a inseminação artificial em vacas leiteiras lactantes em relação a vacas não tratadas.

Entretanto, em um estudo realizado por Alnimer e Lubbadah (2008), a utilização de dispositivo contendo 1,38 gramas de progesterona entre os dias 14 e 21 após a inseminação artificial em vacas leiteiras lactantes, refletiu em maior taxa de concepção aos 45 dias ($42,1 \pm 5,3\%$ versus $35,5 \pm 3,9\%$) e 90 dias ($38,9 \pm 5,2\%$ versus $31,9 \pm 3,8\%$) e tendência ($P=0,082$) a menor taxa de mortalidade embrionária e fetal entre 28 e 45 dias ($11,9 \pm 3,9\%$ versus $17,5 \pm 2,9\%$) em comparação às vacas do grupo controle.

Kumar (2004) obteve melhora ($P<0,05$) na concepção de vacas lactantes repetidoras de cio tratadas com uma injeção de 500 mg de hidroxiprogesterona, via intramuscular, no dia três (43,75%) e no dia cinco (47,73%) após inseminação artificial quando comparadas com vacas não suplementadas (20%). Mehni et al. (2012) também observaram aumento na taxa de concepção em vacas holandesas suplementadas com progesterona (1,9 gramas) intravaginal entre os dias 5 e 19 após a inseminação artificial quando comparadas com grupo controle (56% versus 25%, $P<0,05$), provavelmente pela prevenção da mortalidade embrionária por causa do aumento significativo da progesterona sérica provocada pelo tratamento. De acordo Larson et al. (2007), essa mesma suplementação entre os dias 3,5 e 10 após a inseminação, aumentou a concentração de progesterona no leite e taxa de prenhez em relação ao grupo controle, sendo o efeito do tratamento maior para vacas de primeira e segunda lactação ($P=0,03$).

Villarroel et al. (2004) observaram tendência ($P=0,077$) de menor mortalidade embrionária e fetal em vacas repetidoras de cio tratadas com implante intravaginal com 1,55 gramas de progesterona entre o dia 5 e 19 após a inseminação artificial quando comparadas com vacas não tratadas.

No período de temperaturas elevadas, não houve diferença ($P>0,05$) entre a concentração de progesterona sérica no D13 entre o grupo controle ($0,83 \pm 0,70$ ng/mL) e o grupo tratado ($1,80 \pm 1,99$ ng/mL). Entretanto, no D17, a concentração de progesterona sérica das vacas do grupo tratado foi maior ($P=0,002$) quando comparada ao do grupo controle ($3,89 \pm 2,18$ ng/mL versus $2,38 \pm 1,83$ ng/mL), como pode ser visualizado na Tabela 6.

Não houve diferença ($P>0,05$) entre a concentração de progesterona sérica no D13 entre o grupo controle ($2,77\pm 3,26$ ng/mL) e o grupo tratado ($2,57\pm 2,22$ ng/mL). Da mesma forma, não se observou diferença ($P>0,05$) na concentração de progesterona no D17 entre as vacas do grupo controle e tratado ($2,41\pm 1,74$ ng/mL versus $2,76\pm 1,21$ ng/mL), como apresentado na Tabela 6.

Durante todo o período experimental, as vacas do grupo controle apresentaram concentração média de progesterona no D13 de $1,80\pm 1,98$ ng/mL comparadas com as tratadas que apresentaram $2,19\pm 2,11$ ng/mL ($P>0,05$). No D17, essa concentração passou para $2,40\pm 1,79$ ng/mL no grupo controle e $3,33\pm 1,70$ ng/mL no grupo tratado ($P<0,05$). O incremento de progesterona entre o D13 e D17 foi de $0,60\pm 0,20$ ng/mL de progesterona no grupo controle e $1,14\pm 0,41$ ng/mL no grupo tratado (Tabela 6).

Tabela 6 Média e desvio padrão da concentração de progesterona sérica (ng/mL) no dia 3 (D13) e dia 7 (D17) do ciclo estral, entre os grupos controle e tratado com progesterona após a IATF, de vacas multíparas nos períodos de temperaturas elevadas, temperaturas amenas e durante todo o período experimental.

Período	Grupo	n	D13	D17
Temperaturas elevadas	Controle	23	$0,83\pm 0,70$ A	$2,38\pm 1,83$ A
	Tratado	26	$1,80\pm 1,99$ A	$3,89\pm 2,18$ B
Temperaturas amenas	Controle	32	$2,77\pm 3,26$ A	$2,41\pm 1,74$ A
	Tratado	33	$2,57\pm 2,22$ A	$2,76\pm 1,21$ A
Período experimental	Controle	55	$1,80\pm 1,98$ A	$2,40\pm 1,79$ A
	Tratado	59	$2,19\pm 2,11$ A	$3,33\pm 1,70$ B

Valores indicados com letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si dentro de cada período ($P<0,05$).

A progesterona é fundamental para o estabelecimento e manutenção da prenhez, além de ser responsável por regular a expressão gênica endometrial nos ruminantes (Forde et al., 2009). Estudos mostram correlação entre concentração de progesterona nos primeiros dias após a concepção e sobrevivência embrionária (Mann e Lamming, 2001).

De acordo com o teste de correlação de Pearson (Tabela 7), houve fraca correlação linear ($r=0,2391$, $P=0,0394$) entre concentração de progesterona no D17 do grupo controle e taxa de concepção aos 30 dias. Da mesma forma, a concentração de progesterona de vacas tratadas no D17, obteve moderada correlação linear altamente significativa com a taxa de concepção aos 30 ($r=0,3616$, $P=0,0024$) e 60 dias ($r=0,3683$,

$P=0,0020$). Não foi observada correlação significativa entre os parâmetros avaliados para os demais grupos ($P>0,05$), sugerindo que o tratamento com progesterona no início da fase luteal, parece não melhorar as taxas de concepção por outros fatores que não foram avaliados neste estudo, como taxa de anovulação do protocolo de IATF, ambiência uterina, teste de termorresistência rápido no descongelamento do sêmen nos diferentes períodos, ocorrência de mastite e pododermatites após a IATF e perda de condição corporal após o parto.

Tabela 7 Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre taxa de concepção aos 30 (TC30) e 60 (TC60) dias após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a dosagem de progesterona (P_4) no dia 3 (D13) e dia 7 (D17) do ciclo estral, dos grupos controle e tratado com progesterona após a IATF.

	n	TC30		TC60	
		r	Valor de P	R	Valor de P
Controle					
P ₄ D13	55	-0,0227	0,4346	0,0159	0,4539
P ₄ D17	55	0,2391*	0,0394	0,1591	0,1229
Tratado					
P ₄ D13	59	0,1546	0,1211	0,0827	0,2668
P ₄ D17	59	0,3616*	0,0024	0,3683*	0,0020

*Significativo

O tratamento com implante contendo um grama de progesterona entre o D13 e o D17, foi efetivo em aumentar a concentração de progesterona sérica entre as vacas do grupo tratado em relação ao controle (Tabela 6). Esses dados corroboram com Carter et al. (2010), que suplementaram progesterona através de implante intravaginal contendo 1,55 gramas e observaram aumento de quatro vezes na concentração de progesterona sérica de novilhas da raça Simental tratadas entre o dia 3 e 7 do ciclo estral, comparadas com as do grupo controle ($P<0,05$). O mesmo tratamento foi utilizado em novilhas usadas para cruzamento industrial e foi observado aumento na concentração sérica de progesterona quando comparadas com novilhas não tratadas (Forde et al., 2009).

Pandey et al. (2012) também observaram maiores concentrações plasmáticas de progesterona no grupo de búfalas tratadas com 3 mg do progestágeno norgestomet entre o dia 4 e 10 após a inseminação ($P<0,05$), mas sem efeito na taxa de concepção ($P>0,05$) em relação ao grupo controle.

Como as vacas de ambos grupos tinham em média progesterona acima de 1 ng/mL no D13 (Tabela 6), pode ser que o tratamento foi ineficaz em melhorar a taxa de

concepção das vacas tratadas, uma vez que as vacas tratadas e controle não possuíam déficit deste hormônio esteroide. De acordo com Bó et al. (2007), a suplementação de P₄ somente poderá beneficiar a fertilidade quando a progesterona é limitada. Starbuck et al. (2001) não verificaram melhora na taxa de prenhez de vacas tratadas com progesterona no dia 5 em animais que possuíam níveis de progesterona entre 2 a 3 ng/mL.

Verificou-se, em 14 vacas deste experimento (12,28%), que independente do nível sérico de progesterona apresentado no D13, nenhuma vaca ficou prenhe quando a concentração reduziu abaixo de 1 ng/mL no D17. Esses dados associados ao incremento negativo de progesterona sérica no grupo controle (-0,36±1,52 ng/mL) durante o período de temperaturas amenas, podem indicar luteólise precoce por falha no protocolo de IATF. Pode ser que neste estudo, a taxa de ovulação possa ter comprometido a fertilização e/ou sobrevivência embrionária antes da inserção do dispositivo no dia 3 do ciclo estral. Villarroel et al. (2004) demonstraram em vacas leiteiras, que insuficiência luteal e baixa concentração de progesterona são causas de mortalidade embrionária e redução da taxa de prenhez durante o início do desenvolvimento embrionário.

É reconhecido que uma concentração plasmática de progesterona maior que 1 ng/mL é uma indicação de um corpo lúteo funcional (Mann et al., 2006). Entretanto, ainda não há uma concentração ótima de progesterona estabelecida para melhorar as taxas de concepção em vacas. Sabe-se que, o tempo de aumento da progesterona após a ovulação e a produção contínua de progesterona são importantes para o estabelecimento e manutenção da prenhez (Robinson et al., 2005). Um aumento tardio após a ovulação ou baixa secreção de progesterona durante a fase luteal resulta em pobre desenvolvimento embrionário capaz de produzir pequena ou nenhuma quantidade de interferon-tau no tempo crítico para o reconhecimento materno (Mann e Lamming (1999).

Conclusão

O índice de temperatura e umidade não influenciou a taxa de concepção aos 30 e 60 dias em ambos os grupos avaliados.

O implante intravaginal contendo um grama de progesterona, inserido entre o terceiro e sétimo dia após inseminação artificial em tempo fixo, no intuito de elevar a concentração de progesterona sérica, não teve impacto nas taxas de concepção aos 30 e

60 dias e nas taxas de mortalidade embrionária e fetal de vacas holandesas multíparas tanto em períodos de temperaturas elevadas e amenas do ano.

Referências Bibliográficas

- Alnimer, M.A. e Lubbadeh, W.F., 2008. Effect of progesterone (P4) intravaginal device (CIDR) to reduce embryonic loss and to synchronize return to oestrus of previously timed inseminated lactating dairy cows, *Animal Reproduction Science*, 107 (1-2), 36-47.
- Arndt, W.J., Holle, A.J., Bauer, M.L., Kirsch, J.D., Schimek, D.E., Odde, K.G. e Vonnahme, K.A., 2009. Effect of post-insemination progesterone supplementation on pregnancy rate in dairy cows, *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 73 (4), 271–274.
- Baumgard, L. e Rhoads R., 2012. Efeito do estresse calórico no metabolismo e na produção de leite e estratégias para minimizar efeitos negativos. In: XVI Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos, Uberlândia, MG Brasil. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/conapecjr>>. Acesso em: 22 mar. 2012.
- Bó, G.A., Cutaia, L., Peres, L.C., Pincinato, D., Maraña, D. e Baruselli, P.S., 2007. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle, *The Society for Reproduction and Fertility*, 64, S223-S236.
- Carter, F., Rings, F., Mamo, S., Holker, M., Kuzmany, A., Besenfelder, U., Havlicek, V., Mehta, J.P., Tesfaye, D., Schellander, K. e Lonergan, P., 2010. Effect of elevated circulating progesterone concentration on bovine blastocyst development and global transcriptome following endoscopic transfer of in vitro produced embryos to the bovine oviduct, *Biology of Reproduction*, 83 (5), 707-719.
- Diskin, M.G. e Morris, D.G., 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants, *Reproduction in Domestic Animals*, 43 (suppl. 2), 260-267.

- Ealy, A.D., Drost, M. e Hansen, P.J., 1993. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows, *Journal of Dairy Science*, 76 (10), 2899-2905.
- Ferguson, J. D., Galligan, D. T. e Thomsen, N., 1994. Principal descriptors of body condition score in holstein cows, *Journal of Dairy Science*, 77, 2695-2703.
- 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. e Roche, J.F., 2009. Progesterone-Regulated Changes in Endometrial Gene Expression Contribute to Advanced Conceptus Development in Cattle, *Biology of Reproduction*, 81, 784-794.
- Hansen, P.J. e Arechiga, C.F., 1999. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow, *Journal of Animal Science*, 77 (suppl. 2), 36-50.
- Howard, J.M., Manzo, R., Dalton, J.C., Frago, F. e Ahmadzadeh, A., 2006. Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination, *Animal Reproduction Science*, 95 (3-4), 224-233.
- Kumar, P., 2004. Studies on the effect of progesterone supplementation on conception rate following artificial insemination in normal and repeat breeder cows, (Tese de Doutorado em Veterinária e Ciência Animal, College of Veterinary and Animal Sciences, Himachal Pradesh Agricultural University).
- Larson, S.F., Butler, W.R. e Currie, W.B., 2007. Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination, *Animal Reproduction Science*, 102 (1-2), 172-179.
- Mann, G.E., Fray, M.D. e Lamming, G.E., 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow, *The Veterinary Journal*, 171 (3), 500-503.

- Mann, G.E. e Lamming, G.E., 1999. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle, *Reproduction in Domestic Animals*, 34, 269-274.
- Mann, G.E. e Lamming, G.E., 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows, *Reproduction*, 121, 175-180.
- Maturana Filho, M., Kehrle, A., Scolari, S.C., Miguez, P.H.P., Oliveira, B.M.M. e Madureira, E.H., 2011. Avaliação e comparação dos efeitos do estresse calórico sobre a eficiência reprodutiva de vacas e novilhas nelore durante a estação de monta. In: 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Belém PA, Brasil, pp. 1-3.
- Menhi, S.B., Shabankareh, H.K., Kazemi-Bonchenari, M. e Eghbali, M., 2012. The comparison of treating holstein dairy cows with progesterone, CIDR and GnRH after insemination on serum progesterone and pregnancy rates, *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (1), 131–134.
- National Research Council, 1989. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, 5th ed, National Academy of Sciences, Washington, DC.
- Osman, E. e Erol, A., 2011. Progesterone concentration of pregnant repeat breeder cows following post insemination Prid and GnRH treatments, *Journal Lucrari Stiintifice*, 55, 315-318.
- Pandey, A.K., Dhaliwal, G.S., Ghuman, S.S., Singh, J., Kumar, A. e Agarwal, S.K., 2012. Impact of norgestomet supplementation during early luteal phase on subsequent luteal profiles and conception rate in buffalo: a preliminary study, *Tropical Animal Health and Production*, DOI 10.1007/s11250-012-0217-y [Epub ahead of print].
- Ranieri, A.A., Rodrigues, C.A., Vieira, L.M., Silva, P.R.L.S., Gouvea, G.B., Teixeira, A.L.A., Maio, J.R.G., Sales, J.N.S. e Baruselli, P.S., 2011. Comparação da taxa de prenhez de vacas holandesas de alta produção sincronizadas para IATF com

protocolo a base de progesterona e estradiol ou duplo ovsynch. In: XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Teconologia de Embriões, Cumbuco, PR Brasil, pp. 383.

Ravagnolo, O. e Misztal, I., 2002. Effect of heat stress on nonreturn rate in Holsteins: fixed-model analyses, *Journal of Dairy Science*, 85, 3101-3106.

Robinson, R.S., Hammond, A.J., Hunter, M.G. e Mann, G.E., 2005. The induction of a delayed post-ovulatory progesterone rise in dairy cows: a novel model, *Domestic Animal Endocrinology*, 28 (3), 285-295.

Ryan, D.P., Prichard, J.F., Kopel, E. e Godke, R.A., 1993. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year, *Theriogenology*, 39 (3), 719-737.

Sangsrivavong, S., Combs, D.K., Sartori, R. e Wiltbank, M.C., 2002. High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle, *Journal of Dairy Science*, 85, 2831-2842.

SAS: User's Guide: statistics, 2000. 5.ed. (Cary: SAS Institute).

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

Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S.A., Guenther, J.N., Parrish, J.J. e Wiltbank, M.C., 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter, *Journal of Dairy Science*, 85 (11), 2803-2812.

Smith, J.F., Harner, J.P., Bradford, B.J. e Collier, R.J., 2012. Estratégias de resfriamento de vacas de leite utilizadas nos EUA. In: XVI Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos, Uberlândia, MG Brasil. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/conapecjr>>. Acesso em: 22 mar. 2012.

- Starbuck, G.R., Darwash, A.O., Mann, G.E. e Lamming, G.E., 2001. The detection and treatment of post-insemination progesterone insufficiency in dairy cows. Fertility in the high-producing dairy cow, *British Society of Animal Science*, 26, 447-450.
- Stronge, A.J., Sreenan, J.M., Diskin, M.G., Mee, J.F., Kenny, D.A. e Morris, D.G., 2005. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows, *Theriogenology*, 64, 1212-1224.
- Villa-Mancera, A., Huerta-Crispín, R., Vázquez-Flores, F. e Córdova-Izquierdo, A., 2011. Effect of climate factors on conception rate of lactating dairy cows in Mexico, *Tropical Animal Health and Production*, 43 (3), 597-601.
- Villarroel, A., Martino, A., Bondurante, H.R., Deletang, F. e Sischo, M.W., 2004. Effect of post-insemination supplementation with PRID on pregnancy in repeat-breeder Holstein cows, *Theriogenology*, 61, 1513-1520.
- Wheelock, J.B., Rhoads, R.P., VanBaale, M.J., Sanders, S.R. e Baumgard, L.H., 2010. Effects of heat stress energetic metabolism in lactating holstein cows, *Journal of Dairy Science*, 92 (2), 644-655.