

EMMANUEL MARÇAL GOMES

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROGESTERONA, APÓS A
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO, EM NOVILHAS E
VACAS HOLANDESAS**

GARANHUNS

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES

EMMANUEL MARÇAL GOMES

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROGESTERONA, APÓS A
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO, EM NOVILHAS E
VACAS HOLANDESAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu

Coorientadores:

Dr. Sebastião Inocêncio Guido e

Prof. Dr. André Mariano Batista

GARANHUNS

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROGESTERONA, APÓS A
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO, EM NOVILHAS E
VACAS HOLANDESAS**

Dissertação elaborada por

EMMANUEL MARÇAL GOMES

Aprovado em .28/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Mariano Batista

Presidente da Banca - Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Prof.^a. Dr.^a. Sandra Silva Duarte
Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

DEDICATÓRIA

À minha querida prima Bárbara.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, pelo constante apoio, incentivo e compreensão, principalmente a minha esposa Samantha e aos meus filhos Lucas e Laís, pela paciência e companheirismo.

Aos meus orientadores, Professor Dr. Cláudio Bartolomeu Coutinho, Professor Dr. André Mariano Batista e Dr. Sebastião Inocêncio Guido, pelos conhecimentos compartilhados e dedicação durante todo o período da pós-graduação.

Ao Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), pela liberação durante a pós-graduação e pelo investimento em minha carreira profissional.

A toda equipe da Estação Experimental do IPA em São Bento do Una, em especial ao chefe da Estação, Leonardo Fernandes de Alencar, que me recebeu de portas abertas e foi de fundamental importância na execução dos experimentos.

Ao meu grande amigo, Dr. Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Júnior, pelos esclarecimentos e orientações de grande ajuda na fase final da dissertação.

A todos os professores e colegas que fizeram ou fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da UFRPE-UAG.

RESUMO

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROGESTERONA, APÓS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO, EM NOVILHAS E VACAS HOLANDESAS

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de progesterona (P4) no dia 7 após a inseminação artificial por tempo fixo (IATF) em novilhas e vacas holandesas nos parâmetros morfofisiológicos de área, volume e fluxo sanguíneo (FS) do corpo lúteo (CL); nas concentrações plasmáticas de P4 nos dias 7, 8 e 14 após a IATF; nas taxas de concepção (TC) e perdas embrionárias. Todos os animais foram submetidos a IATF, em seguida distribuídos em dois experimentos. O primeiro com novilhas, subdivididas em grupos: controle NC (n=7), sem suplementação; e tratamento NT300 (n=9), suplementadas com 300 mg de P4. O segundo experimento foi realizado com vacas em lactação, randomizadas em três grupos: controle VC (n=13), sem suplementação; e tratamentos, VT300 (n=11) e VT600 (n=10), suplementadas com 300mg e 600mg de P4, respectivamente. Exames ultrassonográficos foram realizados para avaliar os parâmetros almejados do CL no dia 14 e para os diagnósticos de prenhez nos dias 28 e 60 após IATF. Os dados foram analisados através do procedimento GLIMMIX do SAS. Nas avaliações ultrassonográficas obtivemos no experimento 1: áreas NC ($3,40 \pm 0,46 \text{cm}^2$) e NT300 ($3,41 \pm 0,47 \text{cm}^2$); volumes NC ($5,64 \pm 0,98 \text{cm}^3$) e NT300 ($4,97 \pm 0,85 \text{cm}^3$); e FS NC ($12,3 \pm 4,5\%$) e NT300 ($11,6 \pm 3,8\%$). No experimento 2: áreas VC ($3,80 \pm 0,50 \text{cm}^2$), VT300 ($3,21 \pm 0,37 \text{cm}^2$) e VT600 ($3,92 \pm 0,86 \text{cm}^2$); volumes VC ($6,10 \pm 1,15 \text{cm}^3$), VT300 ($5,10 \pm 0,85 \text{cm}^3$), VT600 ($6,19 \pm 2,00 \text{cm}^3$); e FS VC ($13,6 \pm 3,7\%$), VT300 ($12,1 \pm 2,8\%$) e VT600 ($11,1 \pm 6,5\%$). Nas análises quantitativas das concentrações de P4, foram observados aumentos entre os dias 7 e 8 em todos os animais no experimento com as novilhas, NC ($6,88 - 7,77 \pm 1,01 \text{ng/mL}$), NT300 ($6,87 - 9,51 \pm 0,67 \text{ng/mL}$), e no experimento com as vacas, VC ($4,50 - 3,78 \pm 0,67 \text{ng/mL}$), VT300 ($3,77 - 4,85 \pm 0,61 \text{ng/mL}$) e VT600 ($3,33 - 5,71 \pm 0,62 \text{ng/mL}$); diminuição nas concentrações no dia 14 nos grupos NC ($4,64 \pm 1,01 \text{ng/mL}$), NT300 ($6,24 \pm 0,67 \text{ng/mL}$), VT300 ($3,70 \pm 0,61 \text{ng/mL}$) e VT600 ($5,56 \pm 0,62 \text{ng/mL}$); e incremento no grupo VC ($5,90 \pm 0,67 \text{ng/mL}$). As TC aos 28 dias foram de: NC (57,1%), NT300 (55,5%), VC (61,5%),

VT300 (36,3%) e VT600 (30%). Foram identificadas perdas embrionárias aos 60 dias, apenas nos grupos VC (7,7%) e VT600 (10%). A suplementação de P4 não exerceu influência na formação e função do CL, bem como não aumentou a TC aos 28 e 60 dias após a IATF em novilhas e vacas Holandesas.

Palavras-chave: progesterona, corpo lúteo, fluxo sanguíneo.

ABSTRACT

EFFECTS OF PROGESTERONE SUPPLEMENTATION AFTER FIXED-TIME ARTIFICIAL INSEMINATION IN HEIFERS AND NETHERLANDS COWS

The aim of this study was to evaluate the effects of progesterone supplementation (P4) on day 7 after fixed-time artificial insemination (IATF) in heifers and Holstein cows on the morphophysiological parameters of area, volume and blood flow (FS) of the corpus luteum (CL); plasma P4 concentrations on days 7, 8 and 14 after IATF; conception rates (CT) and embryonic losses. All animals were submitted to IATF, then distributed in two experiments. The first with heifers, subdivided into groups: NC control (n = 7), without supplementation; and NT300 treatment (n = 9), supplemented with 300 mg of P4. The second experiment was carried out with lactating cows, randomized into three groups: VC control (n = 13), without supplementation; and treatments, VT300 (n = 11) and VT600 (n = 10), supplemented with 300mg and 600mg of P4, respectively. Ultrasound examinations were performed to assess the desired parameters of the CL on day 14 and for pregnancy diagnoses on days 28 and 60 after IATF. The data were analyzed using the SAS GLIMMIX procedure. In the ultrasound evaluations we obtained in experiment 1: areas NC ($3.40 \pm 0.46\text{cm}^2$) and NT300 ($3.41 \pm 0.47\text{cm}^2$); NC ($5.64 \pm 0.98\text{cm}^3$) and NT300 volumes ($4.97 \pm 0.85\text{cm}^3$); and FS NC ($12.3 \pm 4.5\%$) and NT300 ($11.6 \pm 3.8\%$). In experiment 2: areas VC ($3.80 \pm 0.50\text{cm}^2$), VT300 ($3.21 \pm 0.37\text{cm}^2$) and VT600 ($3.92 \pm 0.86\text{cm}^2$); volumes VC ($6.10 \pm 1.15\text{cm}^3$), VT300 ($5.10 \pm 0.85\text{cm}^3$), VT600 ($6.19 \pm 2.00\text{cm}^3$); and FS VC ($13.6 \pm 3.7\%$), VT300 ($12.1 \pm 2.8\%$) and VT600 ($11.1 \pm 6.5\%$). In quantitative analyzes of P4 concentrations, increases were observed between days 7 and 8 in all animals in the experiment with heifers, NC ($6.88 - 7.77 \pm 1.01\text{ng / mL}$), NT300 ($6.87 - 9.51 \pm 0.67\text{ng / mL}$), and in the experiment with cows, VC ($4.50 - 3.78 \pm 0.67\text{ng / mL}$), VT300 ($3.77 - 4.85 \pm 0.61\text{ng / mL}$) and VT600 ($3.33 - 5.71 \pm 0.62\text{ng / mL}$); decrease in concentrations on day 14 in the NC ($4.64 \pm 1.01\text{ng / mL}$), NT300 ($6.24 \pm 0.67\text{ng / mL}$), VT300 ($3.70 \pm 0.61\text{ng / mL}$) and VT600 (5 groups), $56 \pm 0.62\text{ng / mL}$; and increase in

the VC group (5.90 ± 0.67 ng / mL). The CT at 28 days were: NC (57.1%), NT300 (55.5%), VC (61.5%), VT300 (36.3%) and VT600 (30%). Embryonic losses at 60 days were identified, only in the VC (7.7%) and VT600 (10%) groups. P4 supplementation did not influence the formation and function of CL, nor did it increase CT at 28 and 60 days after IATF in heifers and Holstein cows.

Keywords: corpus luteum, blood flow, steroids.

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1. Área, volume e fluxo sanguíneo do CL no dia 14 após a IATF em Novilhas Holandesas.

Tabela 2. Área, volume e fluxo sanguíneo do CL no dia 14 após a IATF em Vacas Holandesas.

Tabela 3. Taxa de concepção entre os dias 28 e 60 após IATF, nas Novilhas submetidas aos tratamentos.

Tabela 4. Taxa de concepção entre os dias 28 e 60 após IATF, das Vacas submetidas aos tratamentos.

Gráfico 1. Concentrações de P4 em Novilhas Holandesas, grupos controle e tratamento com 300mg, nos dias 7, 8 e 14 após IATF.

Gráfico 2. Concentrações de P4 em Vacas Holandesas, grupos controle e tratamento com 300mg e 600mg, nos dias 7, 8 e 14 após IATF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama do protocolo de sincronização a ser utilizado no experimento.

Figura 2. Imagem ultrassonográfica com Doppler de corte transversal de um CL bovino no 14º dia do ciclo estral.

Figura 3. Edição de imagem ultrassonográfica com software IMAGEJ® para mensuração da área do fluxo sanguíneo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE - Benzoato de estradiol

°C – Graus *Celsius*

CIDR - Dispositivo intravaginal de progesterona

CL - Corpo Lúteo

cm² - Centímetros quadrados

cm³ - Centímetros cúbicos

ECC - Escore de Condição Corporal

eCG - Gonadotrofina Coriônica Equina

hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

IA - Inseminação Artificial

i.m. - Intramuscular

IATF - Inseminação Artificial em Tempo Fixo

LH - Hormônio Luteinizante

P4- Progesterona

PGF2 α - Prostaglandina F2alfa

MHz - Megahertz

mL - Mililitro

ng – Nanograma

UI – Unidade internacional

US –Exame ultrassonográfico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. GERAL	14
2.2. ESPECÍFICO	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
4. REFERÊNCIAS	19
5. ARTIGO CIENTÍFICO	25
RESUMO	26
ABSTRACT	27
6. INTRODUÇÃO	28

7. MATERIAL E MÉTODOS	29
Local do estudo	29
Animais	29
Protocolo de sincronização do estro	30
Delineamento experimental	30
Amostras de sangue	30
Exames ultrassonográficos e processamento das imagens	31
Análise estatística	33
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
9. CONCLUSÃO.....	37
10. REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

Sistemas eficientes de produção de leite requerem alto desempenho reprodutivo de seus rebanhos. Apesar de vacas Holandesas de alto mérito genético produzirem mais leite em sistemas intensivos e semi-intensivos, geralmente é relatado comprometimento de sua fertilidade. Assim, o manejo de animais de alto mérito genético proporciona grandes desafios nos sistemas de produção, onde se observam perdas embrionárias superiores a 20% nos primeiros 7 dias de prenhez (DISKIN et al., 2006).

A progesterona (P4) é um hormônio esteroide derivado do colesterol, que tem ação crucial nos eventos reprodutivos envolvidos com o processo de ovulação, reconhecimento, estabelecimento e manutenção da gestação (FORDE et al., 2009; BAZER et al., 2012).

Atuando em diversas funções, promovendo o acréscimo das glândulas endometriais e mamárias, estimulando a atividade secretora no interior dos ovidutos e das glândulas endometriais, na regulação da liberação de gonadotrofinas e na interrupção das contrações uterinas (SWENSON e REECE, 1996; STRONGE et al., 2005).

Porém, existem evidências de que concentrações de progesterona muito baixas como muito altas estão associadas negativamente com a taxa de sobrevivência embrionária (DISKIN et al., 2006 e 2011; FORDE et al., 2011).

Portanto, concentrações séricas adequadas de progesterona são necessárias, uma vez que, estão associadas ao desenvolvimento e alongamento do embrião e a consequente produção e liberação de interferon-Tau em concentrações adequadas à manutenção do CL, diminuindo a probabilidade de morte embrionária (DISKIN e MORRIS e CARTE et al., 2008).

Shelton et al., (1990); Larson et al., (1997); Mann et al., (2001) e Starbuck et al., (2001) relataram que a duração e a concentração circulante da P4 podem ser críticas para a sobrevivência embrionária, e observaram que concentrações sistêmicas baixas de P4 5 dias após ovulação ou um comprometimento da liberação entre os dias 4-5 foram associadas à menor crescimento embrionário, redução na liberação de interferon-Tau com diminuição da capacidade de inibição da lise do CL e diminuição das taxas de concepção.

Analisando seus experimentos, Mann e Lamming (1999) também relataram a importância da P4 para a produção e a liberação de nutrientes além de fatores de crescimento no ambiente uterino, fundamentais para o desenvolvimento embrionário.

Em outro trabalho, Diskin e Morris (2008) relataram taxas de natalidade em torno de 55%, destacando que a maioria das perdas embrionárias ocorrem entre os dias 8 e 16 após a inseminação.

Pugliesi et al. (2014) em experimento com vacas de corte observaram efeitos positivos, com a elevação nos níveis circulantes de P4 por ≥ 3 dias, em animais com baixo escore corporal suplementados com 300mg de P4 de longa ação, no terceiro dia após a IATF.

Apesar dos efeitos embriotróficos das concentrações aumentadas de P4, a administração de P4 durante o metaestro ou o diestro precoce, 1 a 3 dias após o cio, podem

comprometer o desenvolvimento do CL (O'Hara et al. 2014). Indo de encontro com os achados de Stronge et. al. (2005) que identificou uma relação linear negativa entre a concentração de progesterona no leite no dia 4 e a sobrevivência dos embriões, e uma correlação positiva com a concentração de progesterona elevada no leite nos dias 5, 6 e 7.

Diante do exposto, suplementar artificialmente com P4 animais submetidos a protocolos de inseminação, entre a fase inicial do diestro e o período crítico do reconhecimento materno, podem eventualmente favorecer uma diminuição de perdas embrionárias em vacas de alta produtividade.

2. OBJETIVOS

2.1.GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação exógena de progesterona injetável no dia 7 após a IATF, na função do corpo lúteo e fertilidade em novilhas e vacas Holandesas.

2.2.ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito da suplementação exógena de progesterona no dia 7, após a IATF de novilhas e vacas lactantes Holandesas;
- Avaliar o efeito da suplementação de progesterona no dia 7 após a IATF, na taxa de concepção e perda de prenhez, em novilhas e vacas Holandesas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Progesterona

A progesterona (P4) tem papel crucial nos eventos que envolvem o estabelecimento e a manutenção da gestação, níveis elevados deste esteroide, no plasma sanguíneo, durante a fase de diestro de vacas recém-inseminadas, contribuem para o bloqueio da hipófise e do ciclo sexual, antagonizam os efeitos dos estrógenos, proporcionando o relaxamento miometrial, a recepção, nutrição, fixação e crescimento do embrião, promovendo também o desenvolvimento alveolar do úbere (FORDE et al., 2009; BAZER et al., 2012). Eventos estes, associados ao alongamento do embrião e produção de interferon-Tau favorecendo maiores taxas de prenhez por IA (P/IA) (DISKIN e MORRIS, 2008; STRONGE et al., 2005).

As concentrações plasmáticas de P4 apresentam variações durante todo ciclo estral, sendo observadas concentrações inferiores a 1ng/mL durante o estro, elevação em seus níveis séricos durante o diestro (2 a 3ng/mL; raças zebuínas) (ADEYEMO e HEATH, 1980), (até 16ng/mL, raças europeias) (BADINGA et al., 1994), e retornando aos seus níveis basais antes do início de um novo ciclo. Estando bem estabelecido que concentrações plasmáticas superiores a 1ng/mL são tidas como principal critério de avaliação da presença e viabilidade funcional do corpo lúteo (CL) (BATTOCCHIO et al, 1999).

Wiltbank et al. (2006 e 2014) relatam que a P4 primordialmente produzida pelo CL e posteriormente pela placenta, tem como via de metabolização o fígado, com suas concentrações séricas intimamente associadas ao consumo de matéria seca pelos animais, desta forma, observa-se maior catabolismo dos esteroides decorrente do aumento no fluxo sanguíneo, expondo a P4 plasmática mais vezes às células hepáticas.

A fase luteal, período de formação do CL, tem como principal característica a elevação nas concentrações plasmáticas de P4, que se iniciam a partir do terceiro ou quarto dia da luteogênese, tendo suas concentrações incrementadas durante o acréscimo do tecido luteal que se mantém até o 10° ou 14° dia do ciclo estral, assegurando estes níveis no plasma até o processo de luteólise concluída por volta do 17° ao 18° dia após a ovulação, compreendendo assim, a fase mais longa do ciclo estral dos bovinos (HAFEZ et al., 2000).

A manutenção fisiológica do CL além do 16° dia do ciclo, ocorre caso haja sucesso por parte do concepto em promover o reconhecimento materno da gestação, garantindo a vida útil do CL por mais 200 dias (NISWENDER et al.; HAFEZ et al., 2000). Mesmo ocorrendo o reconhecimento materno da gestação, concentrações insuficientes de P4, entre as fases de

mórula e blastocisto comprometem o desenvolvimento embrionário, minimizando sua capacidade de produção de interferon-Tau e conseqüentemente o transcorrer da gestação (MANN e LAMMING, 2001).

Embasados na concepção de que concentrações circulantes de P4 podem comprometer a fertilidade, diversos trabalhos foram realizados com o intuito de suplementar os níveis séricos de P4 e conseqüentemente procurar aumentar a fertilidade. Os primeiros estudos com essa finalidade foram realizados ainda na década de 50, com injeções de P4 de longa ação, administradas logo após a IA. (WILTBANK et al. 1965 e JOHNSON et al, 1958).

Existem alternativas propostas em vários trabalhos, com o intuito de proporcionar incremento nas concentrações plasmáticas de P4 durante o diestro como, aumentar a área do tecido luteal com a administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) entre os dias 2 e 5 subsequentes ao cio (HOWARD et al. 2006; MAILLO et al. 2013); estimular a formação de um CL acessório com a indução de uma nova ovulação 5 dias após a IA, empregando hormônios como LH, GnRH ou hCG (HOWARD et al. 2006; STEVENSON et al. 2007; MACHADO et al 2008; ROSSETTI et al. 2011); fazer a suplementação exógena de P4, a partir de dispositivos intravaginais com progestágenos por 3 a 7 dias (CARTER et al. 2008; O'HARA et al. 2014); ou recorrer à aplicação parenteral com fórmulas injetáveis de P4 com ação prolongada (BELTMAN et al., 2009).

Forde et al. (2011) ao utilizarem dispositivos intravaginais para suplementação de P4 no 3º dia após a IA, identificaram concentrações séricas de P4 significativamente aumentadas entre os oito primeiros dias após a IA, não influenciando expressões gênicas do endométrio nos primeiros 5 a 7 dias após a ovulação, no entanto, quando comparados a estágios mais avançados, 7 a 13 dias, relatam que o tratamento promoveu aumento nas expressões, alterando significativamente o endométrio, e favorecendo um ambiente uterino mais favorável para o desenvolvimento embrionário. Porém, ao compararem com animais que apresentavam concentrações P4 <1,0ng/mL nos primeiros 7 dias após a IA, observaram que estes evidenciaram retardo das expressões gênicas do endométrio, com conseqüente perda de receptores de P4 comprometendo o útero em apoiar o desenvolvimento do concepto.

Já Mehni et al. (2012) avaliaram a suplementação de P4 por meio de dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®) entre os dias 5 e 19 pós IA e identificaram um

incremento na concentração plasmática de P4 e elevação da prenhez/IA em vacas Holandesas. Em estudos semelhantes outros pesquisadores também obtiveram correlações positivas entre a taxa de sobrevivência embrionária e a elevação da concentração sérica de P4 quando novilhas foram suplementadas entre os dias 3 e 6,5 pós IA (BELTMAN et al., 2009; CARTER et al., 2010). Em contraposição a esses resultados, Osman e Erol (2011) em seus experimentos não conseguiram aumentar a taxa de concepção em vacas repetidoras de cio e Arndt et al. (2009) também não observaram diferenças nas concentrações séricas de P4, nas taxas de concepção e nas mortes embrionárias em vacas de leite.

Em compilações de trabalhos pesquisados Stronge et al. (2005), mencionam divergências nos efeitos quanto aos níveis de P4 no plasma sanguíneo, quando comparados o período de suplementação, as elevações e as concentrações dos níveis plasmáticos de P4 após a IA. Foram apresentados em seus delineamentos uma relação positiva entre a elevação dos níveis plasmáticos nos dias 5, 6 e 7 após a IA com avaliação da taxa de sobrevivência embrionária ao 30º dia após o serviço. Revelando que 75, 72 e 56% das vacas analisadas tinham concentrações ideais para concepção, nestes respectivos dias (STRONGE et al., 2005). Dentro dos parâmetros deste mesmo estudo, Stronge e colaboradores (2005), correlacionaram concentrações de progesterona no leite de 7,4 ng/mL no dia 5 com a sobrevivência máxima do embrião, enquanto nos dias 6 e 7 foram constatadas concentrações de 13,2 e 16,8ng/mL respectivamente, nestes dois dias; concentrações mais baixas ou mais altas foram associadas à redução da sobrevivência embrionária.

Contudo, valores absolutos nas concentrações plasmáticas de P4, logo após a IA, durante o metaestro ou na fase inicial do diestro, nos três primeiros dias após a ovulação, comprometem o desenvolvimento do CL e/ou mesmo promovem sua luteólise precoce, atribuindo que concentrações elevadas de P4 neste período, agem de forma inibitória na secreção de LH pela hipófise (BARATTA et al., 1994; STRONGE et al., 2005 e O'HARA et al., 2014).

Ultrassonografia e Perfusão sanguínea do Corpo Lúteo

O advento da ultrassonografia em cores com Doppler tornou possível examinar a intensidade do fluxo sanguíneo em direção ao CL e também no CL, por meio da observação

do movimento dos glóbulos vermelhos nos vasos (ACOSTA e MIYAMOTO, 2004; GINTHER, 2007).

A Ultrassonografia (US) é uma técnica de visualização pouco invasiva que proporcionou uma compreensão melhor dos eventos fisiológicos e suas alterações, no ciclo estral e na gestação dos animais domésticos; oferecendo à ginecologia bovina a possibilidade de mensurar, quantificar e distinguir melhor folículos e corpos lúteos, fomentando parâmetros e status funcionais mais adequados (VERONESI, 2002).

O tecido luteal é composto por vários tipos celulares, como células luteais grandes e pequenas, células endoteliais vasculares e pericitos, tendo em sua formação mais de 50% de células oriundas do sistema vascular (GINTHER, 2007).

A formação de uma rede capilarizada no entorno do CL tem estreita correlação entre seu fluxo sanguíneo e sua capacidade de produzir P4, enfatizando que um aporte maior no suprimento sanguíneo luteal representa uma condição prévia importante para a secreção de P4, fornecendo oxigênio, nutrientes, precursores de esteroides e gonadotrofinas, promovendo a síntese de progesterona e a manutenção das funções ovarianas (ACOSTA e MYAMOTO, 2004).

Ginter (2007) associou alterações na vascularização lútea com os processos de luteinização e formação do CL. A angiogênese é crítica para o desenvolvimento do CL, uma vez que uma vascularização inadequada compromete a função lútea. Desta forma, níveis de P4 estão diretamente envolvidos com o aporte e o fluxo de sangue luteal e podem ser avaliados de forma confiável a partir de exames ultrassonográficos com Doppler colorido. O emprego deste recurso proporcionou aos pesquisadores a possibilidade de avaliações mais detalhadas do fluxo sanguíneo dessas estruturas, capazes de refletir indiretamente a funcionalidade da glândula, permitindo que o profissional realize inferências quanto ao estado funcional do tecido (SINGH et al., 2003; GINTHER, 2007; HERZOG et al., 2010).

Perdas embrionárias

Com o advento da digitalização por ultrassom, tornou-se relativamente fácil estabelecer com precisão a extensão e o tempo da mortalidade fetal embrionária tardia. Silke et al. (2001) quantificaram o período e o padrão da perda fetal embrionária entre os dias 28 a 84 de gestação em 1046 vacas em lactação e 162 novilhas leiteiras gerenciadas em sistemas

de produção de leite semi-intensivo. As taxas gerais de perda entre os dias 28 e 84 de gestação e o padrão de perda nesse período são semelhantes para vacas (7,2%), produzindo em média 7.247 kg de leite e novilhas (6,1%). Quase metade (47,5%) da perda total registrada ocorreu entre os dias 28 e 42 de gestação. Estudo semelhante conduzido por Horan et al. (2004), encontraram taxa geral de perda fetal tardia, em animais avaliados entre os dias 30 e 67 de prenhez, de 7,5% compatível a obtida nos experimentos realizados por Silke e colaboradores.

4. REFERÊNCIAS:

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animals Reproduction Science**, v. 82–83, p. 127–140, 2004.

ADEYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in Bos Taurus and Bos indicus heifers. **Theriogenology**, New York, v. 14, n. 6, p. 411-420, 1980.

ARNDT, W. J.; HOLLE, A. J.; BAUER, M. L.; KIRSCH, J. D.; SCHIMEK, D. E.; ODDE, K. G.; VONNAHME, K. A. Effect of post-insemination progesterone supplementation on pregnancy rate in dairy cows. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 4, p. 271–274, 2009.

BADINGA, L.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J.; MORRIS, G.; ENTWISTLE, K.; WOLFENSOR, D. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol 17-beta, progesterone and luteinizing hormone in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, New York, v. 42, n. 8, p. 1263-1274, 1994.

BARATTA, M.; GRASSELLI, F.; TAMANINI, C. Effects of gonadal steroids on tonic luteinizing hormone (LH) release and luteinizing hormone-releasing hormone-induced LH release from bovine pituitary cells cultured in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 1320–1327, 1994.

BATTOCCHIO, M.; GABAI, G.; MOLLO, A.; VERONESI, MC.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. **Theriogenology**, v. 51, p. 1059-1069, 1999.

BAZER, F. W.; KIM, J; SONG, G; KA, H; TEKWE, C. D.; WU, G. Select nutrients, progesterone, and interferon tau affect conceptus metabolism and development. **Annals of The New York Academy of Sciences**. Issue: Nutrition and Physical Activity in Aging, Obesity, and Cancer, 2012.

BELTMAN, M.E.; ROCHE, J.F.; LONERGAN, P.; FORDE, N.; CROWE, M.A. Evaluation of models to induce low progesterone during the early luteal phase in cattle. **Theriogenology**, v. 72, p. 986–992, 2009.

BRONSON, A.; EDWARDS, T. Management of pregnant heifers in the feedlot. *In*: **Proceedings of the Academy of Veterinary Consultants**. Canada: Calgary, 2008. p. 27–38.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C. O.; KENNY, D. A.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 3, p. 368-375, 2008.

CARTER, F.; RINGS, F.; MAMO, S.; HOLKER, M.; KUZMANY, A.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; MEHTA, J. P.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K.; LONERGAN, P. 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**, v. 83, n. 5, p. 707-719, 2010.

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

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, s. 2, p. 260–267, 2008.

EDMONSON, A. J., I. J.; LEAN, L. D.; WEAVER, T. F.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p 68–78, 1989.

FORDE, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C. O.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; McBRIDE, R.; BOLAND, M. P.; O’GAORA, P.; LONERGAN, P.; ROCHE, J. F. Progesterone-Regulated Changes in Endometrial Gene Expression Contribute to

Advanced Conceptus Development in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 784-794, 2009.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; DUFFY, G. B.; DUFFY, P.; MEHTA, J. P.; O'GAORA, P.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; CROWE, M. A. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. **Biology of Reproduction**, v. 84, p. 266–278, 2011.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography**. Editor Equiservices Publishing, Cross Plains, WI, 2007.

HAFEZ, B. e HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in Farm Animals**. Baltimore, ed 7, 2000.

HERZOG, K.; BROCKHAN-LUDEMANN, M.; KASKE, M.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v. 73, p.691–697, 2010.

HORAN, B.; MEE, JF.; RATH, M.; O'CONNOR, P.; DILLON, P. The effect of strain of Holstein–Friesian cow and feeding system on reproductive performance in seasonal-calving milk production systems. **Animal Science**, v. 79, p. 453–467, 2004.

HOWARD, J. M.; MANZO, R.; DALTON, J. C.; FRAGO, F.; AHMADZADEH, A. Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 95, p. 224–233, 2006.

JOHNSON, K. R.; ROSS, R. H.; FOURT, D. L. Effect of progesterone administration on reproductive efficiency. **Journal Animal Science**, v. 17, p.386-90, 1958.

LARSON, S. F.; BUTLER, W. R.; CURRIE, W. B. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p.1288–95, 1997.

MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M. A.; BARBOSA, R. T.; DE OLIVEIRA, C. A.; BINELLI, M. Ovarian function in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows after post-ovulation hormonal treatments. **Theriogenology**, v. 69, p. 798–804, 2008.

MAILLO, V.; DUFFY, P.; O'HARA, L.; DE FRUTOS, C.; KELLY, A. K.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. C. Effect of hCG administration during corpus luteum establishment on subsequent corpus luteum development and circulating progesterone concentrations in beef heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, p. 367-374, 2013.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, p. 269-274, 1999.

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

MEHNI, S. B.; SHABANKAREH, H. K.; KAZEMI-BONCHENARI, M.; EGHBALI, M. The comparison of treating Holstein dairy cows with progesterone, CIDR and GnRH after insemination on serum progesterone and pregnancy rates. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 1, p. 131-134, 2012.

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

O'HARA, L.; FORDE, N.; CARTER, F.; RIZOS, D.; MAILLO, V.; EALY, A. D.; KELLY, A. K.; RODRIGUEZ, P.; ISAKA, N.; EVANS, A. C. O.; LONERGAN, P. Paradoxical effect of supplementary progesterone between Day 3 and Day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v. 26, p. 328-336, 2014.

OSMAN, E.; EROL, A. Progesterone concentration of pregnant repeat breeder cows following post insemination Prid and GnRh treatments. **Journal Lucrari Stiintifice**, v. 55, p. 315-318, 2011.

PARR, M. H.; MULLEN, M.P.; CROWE, M. A.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Relationship between pregnancy per artificial insemination and early luteal

concentrations of progesterone and establishment of repeatability estimates for these traits in Holstein-Friesian heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 2390-2396, 2012.

PUGLIESI, G.; OLIVEIRA, M. L.; SCOLARI, S.C.; LOPES, E.; PINAFFI, F.V.; MIAGAWA, B. T.; PAIVA, N. Y.; MAIO, J. R. G.; NOGUEIRA, G. P.; BINELLI, M. Corpus Luteum Development and Function after Supplementation of Long-Acting Progesterone During the Early Luteal Phase in Beef Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p. 85-91, 2014.

RIVERA, H.; LOPEZ, H.; FRICKE, P. M. Fertility of Holstein dairy heifers after synchronization of ovulation and timed AI after removed tail chalk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2051–2061, 2004.

ROSSETTI, R. C.; PERDIGÃO, A.; MESQUITA, F. S.; SÁ FILHO, M.; NOGUEIRA, G. P.; MACHADO, R.; MEMBRIVE, C. M.; BINELLI, M. Effects of flunixin meglumine, recombinant bovine somatotropin and/or human chorionic gonadotropin on pregnancy rates in Nelore cows. **Theriogenology**, v. 76, p. 751–758, 2011.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle, An overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 241–251, 2004.

SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9 (7), p. 671–675, 2012.

SHELTON, K.; GAYERIE DE ABREU, M. F.; HUNTER, M. G.; PARKINSON, T. J.; LAMMING, G. E. Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. **Journals of Reproduction e Fertility**, v. 90, p. 1–10, 1990.

SINGH, J.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. **Animals Reproduction Science**, v. 78, p. 371–399, 2003.

SILKE, V.; DISKIN, M. G.; KENNY, D. A.; BOLAND, M. P.; DILLON, P.; MEE, J. F.; SREENAN, J. M. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. **Animals Reproduction Science**, v. 15, p. 1–12, 2001.

STARBUCK, G. R.; DARWASH, A. O.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The detection and treatment of post-insemination progesterone insufficiency in dairy cows. Fertility in the high-producing dairy cow. **Brit Soc. Animals Science**, Occasional Publication; v. 26, p. 447–450, 2001.

STEVENSON, J. S.; PORTALUPPI, M. A.; TENHOUSE, D. E.; LLOYD, A.; EBORN, D. R.; KACUBA, S.; DEJARNETTE, J. M. Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 331–340, 2007.

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

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. Dukes - **Fisiologia dos animais domésticos**. 11^o ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 902, 1996.

VERONESI, M. C.; GABAI, G.; BATTOCCHIO, M.; MOLLO, A.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Ultrasonographic appearance of tissue is a better indicator of CL function than CL diameter measurement in dairy cows. **Theriogenology**, v. 8, p.58-61, 2002.

WILTBANK, J. N.; HAWK, H. W.; KIDDER, H. E.; BLACK, W. G.; ULBERG, L. C.; CASIDA, L. E. Effect of progesterone therapy on embryos survival in cows of lowered fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 39, p 546-61, 1956.

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

WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; CUNHA, A. P.; GIORDANO, J. O.; FRICKE, P. M.; BAEZ, G. M. and DISKIN, M. G. Efeitos fisiológicos e práticos da progesterona na reprodução em gado leiteiro. **Animal**, v. 8, s1, p. 70–81, 2014.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Formatado para revista Pesquisa Agropecuária Pernambucana

Efeitos da suplementação de progesterona, após a inseminação artificial em tempo fixo, em novilhas e vacas Holandesas

Effects of progesterone supplementation after fixed-time artificial insemination in heifers and netherlands cows

Emmanuel Marçal Gomes¹, Sebastião Inocêncio Guido², André Mariano Batista³, Pedro Leopoldo J. Monteiro⁴, Cláudio Coutinho Bartolomeu³

¹ Departamento de Extensão Rural, Instituto Agronômico de Pernambuco, Garanhuns, PE, Brasil. ² Departamento de Pesquisa, Instituto Agronômico de Pernambuco, São Bento do Una, PE, Brasil. ³ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. ⁴ Departamento de Ciência do Leite, Universidade de Wisconsin, Madison, WI, EUA.

Autor para correspondência: Instituto Agronômico de Pernambuco, Regional Garanhuns, Av. Caruaru, s/n, São José, Garanhuns, PE, 55295-380, Brasil.

E-mail / Telefone: emmanuelmarcal@ipa.br / (87) 3761-8199.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de progesterona (P4) no dia 7 após a inseminação artificial por tempo fixo (IATF) em novilhas e vacas holandesas nos parâmetros morfofisiológicos de área, volume e fluxo sanguíneo (FS) do corpo lúteo (CL); nas concentrações plasmáticas de P4 nos dias 7, 8 e 14 após a IATF; nas taxas de concepção (TC) e perdas embrionárias. Todos os animais foram submetidos a IATF, em seguida distribuídos em dois experimentos. O primeiro com novilhas, subdivididas em grupos: controle NC (n=7), sem suplementação; e tratamento NT300 (n=9), suplementadas com 300 mg de P4. O segundo experimento foi realizado com vacas em lactação, randomizadas em três grupos: controle VC (n=13), sem suplementação; e tratamentos, VT300 (n=11) e VT600 (n=10), suplementadas com 300mg e 600mg de P4, respectivamente. Exames ultrassonográficos foram realizados para avaliar os parâmetros almejados do CL no dia 14 e para os diagnósticos de prenhez nos dias 28 e 60 após IATF. Os dados foram analisados através do procedimento GLIMMIX do SAS. Nas avaliações ultrassonográficas obtivemos no experimento 1: áreas NC ($3,40 \pm 0,46 \text{cm}^2$) e NT300 ($3,41 \pm 0,47 \text{cm}^2$); volumes NC ($5,64 \pm 0,98 \text{cm}^3$) e NT300 ($4,97 \pm 0,85 \text{cm}^3$); e FS NC ($12,3 \pm 4,5\%$) e NT300 ($11,6 \pm 3,8\%$). No experimento 2: áreas VC ($3,80 \pm 0,50 \text{cm}^2$), VT300 ($3,21 \pm 0,37 \text{cm}^2$) e VT600 ($3,92 \pm 0,86 \text{cm}^2$); volumes VC ($6,10 \pm 1,15 \text{cm}^3$), VT300 ($5,10 \pm 0,85 \text{cm}^3$), VT600 ($6,19 \pm 2,00 \text{cm}^3$); e FS VC ($13,6 \pm 3,7\%$), VT300 ($12,1 \pm 2,8\%$) e VT600 ($11,1 \pm 6,5\%$). Nas análises quantitativas das concentrações de P4, foram observados aumentos entre os dias 7 e 8 em todos os animais no experimento com as novilhas, NC ($6,88 - 7,77 \pm 1,01 \text{ng/mL}$), NT300 ($6,87 - 9,51 \pm 0,67 \text{ng/mL}$), e no experimento com as vacas, VC ($4,50 - 3,78 \pm 0,67 \text{ng/mL}$), VT300 ($3,77 - 4,85 \pm 0,61 \text{ng/mL}$) e VT600 ($3,33 - 5,71 \pm 0,62 \text{ng/mL}$); diminuição nas concentrações no dia 14 nos grupos NC ($4,64 \pm 1,01 \text{ng/mL}$), NT300 ($6,24 \pm 0,67 \text{ng/mL}$), VT300 ($3,70 \pm 0,61 \text{ng/mL}$) e VT600 ($5,56 \pm 0,62 \text{ng/mL}$); e incremento no grupo VC ($5,90 \pm 0,67 \text{ng/mL}$). As TC aos 28 dias foram de: NC (57,1%), NT300 (55,5%), VC (61,5%), VT300 (36,3%) e VT600 (30%). Foram identificadas perdas embrionárias aos 60 dias, apenas nos grupos VC (7,7%) e VT600 (10%). A suplementação de P4 não exerceu influência na formação e função do CL, bem como não aumentou a TC aos 28 e 60 dias após a IATF em novilhas e vacas Holandesas.

Palavras-chave: progesterona, corpo lúteo, fluxo sanguíneo.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of progesterone supplementation (P4) on day 7 after fixed-time artificial insemination (IATF) in heifers and Holstein cows on the morphophysiological parameters of area, volume and blood flow (FS) of the corpus luteum (CL); plasma P4 concentrations on days 7, 8 and 14 after IATF; conception rates (CT) and embryonic losses. All animals were submitted to IATF, then distributed in two experiments. The first with heifers, subdivided into groups: NC control (n = 7), without supplementation; and NT300 treatment (n = 9), supplemented with 300 mg of P4. The second experiment was carried out with lactating cows, randomized into three groups: VC control (n = 13), without supplementation; and treatments, VT300 (n = 11) and VT600 (n = 10), supplemented with 300mg and 600mg of P4, respectively. Ultrasound examinations were performed to assess the desired parameters of the CL on day 14 and for pregnancy diagnoses on days 28 and 60 after IATF. The data were analyzed using the SAS GLIMMIX procedure. In the ultrasound evaluations we obtained in experiment 1: areas NC ($3.40 \pm 0.46\text{cm}^2$) and NT300 ($3.41 \pm 0.47\text{cm}^2$); NC ($5.64 \pm 0.98\text{cm}^3$) and NT300 volumes ($4.97 \pm 0.85\text{cm}^3$); and FS NC ($12.3 \pm 4.5\%$) and NT300 ($11.6 \pm 3.8\%$). In experiment 2: areas VC ($3.80 \pm 0.50\text{cm}^2$), VT300 ($3.21 \pm 0.37\text{cm}^2$) and VT600 ($3.92 \pm 0.86\text{cm}^2$); volumes VC ($6.10 \pm 1.15\text{cm}^3$), VT300 ($5.10 \pm 0.85\text{cm}^3$), VT600 ($6.19 \pm 2.00\text{cm}^3$); and FS VC ($13.6 \pm 3.7\%$), VT300 ($12.1 \pm 2.8\%$) and VT600 ($11.1 \pm 6.5\%$). In quantitative analyzes of P4 concentrations, increases were observed between days 7 and 8 in all animals in the experiment with heifers, NC ($6.88 - 7.77 \pm 1.01\text{ng / mL}$), NT300 ($6.87 - 9.51 \pm 0.67\text{ng / mL}$), and in the experiment with cows, VC ($4.50 - 3.78 \pm 0.67\text{ng / mL}$), VT300 ($3.77 - 4.85 \pm 0.61\text{ng / mL}$) and VT600 ($3.33 - 5.71 \pm 0.62\text{ng / mL}$); decrease in concentrations on day 14 in the NC ($4.64 \pm 1.01\text{ng / mL}$), NT300 ($6.24 \pm 0.67\text{ng / mL}$), VT300 ($3.70 \pm 0.61\text{ng / mL}$) and VT600 (5 groups), $56 \pm 0.62\text{ng / mL}$); and increase in the VC group ($5.90 \pm 0.67\text{ng / mL}$). The CT at 28 days were: NC (57.1%), NT300 (55.5%), VC (61.5%), VT300 (36.3%) and VT600 (30%). Embryonic losses at 60 days were identified, only in the VC (7.7%) and VT600 (10%) groups. P4 supplementation did not influence the formation and function of CL, nor did it increase CT at 28 and 60 days after IATF in heifers and Holstein cows.

Keywords: corpus luteum, blood flow, steroids.

INTRODUÇÃO

Sistemas eficientes de produção de leite requerem alto desempenho reprodutivo de seus rebanhos. Apesar de vacas Holandesas de alto mérito genético produzirem mais leite em sistemas intensivos e semi-intensivos, geralmente é relatado comprometimento de sua fertilidade. Assim, o manejo de animais de alto mérito genético proporciona grandes desafios nos sistemas de produção, onde se observam perdas embrionárias superiores a 20% nos primeiros 7 dias de prenhez (DISKIN et al., 2006).

A progesterona (P4) é um hormônio esteroide derivado do colesterol, que tem ação crucial nos eventos reprodutivos envolvidos com o processo de ovulação, reconhecimento,

estabelecimento e manutenção da gestação. Atuando em diversas funções, promovendo o acréscimo das glândulas endometriais e mamárias, estimulando a atividade secretora no interior dos ovidutos e das glândulas endometriais, na regulação da liberação de gonadotrofinas e na interrupção das contrações uterinas (SWENSON e REECE, 1996; STRONGE et al., 2005).

Porém, existem evidências de que concentrações de progesterona muito baixas como muito altas estão associadas negativamente com a taxa de sobrevivência embrionária (DISKIN et al., 2006 e 2011; FORDE et al., 2011).

Portanto, concentrações séricas adequadas de progesterona são necessárias, uma vez que, estão associadas ao desenvolvimento e alongamento do embrião e a consequente produção e liberação de interferon-Tau em concentrações adequadas à manutenção do CL, diminuindo a probabilidade de morte embrionária (DISKIN e MORRIS e CARTE et al., 2008).

Shelton et al., (1990); Larson et al., (1997); Mann et al., (2001) e Starbuck et al., (2001) relataram que a duração e a concentração circulante da P4 podem ser críticas para a sobrevivência embrionária, e observaram que concentrações sistêmicas baixas de P4 5 dias após ovulação ou um comprometimento da liberação entre os dias 4-5 foram associadas à menor crescimento embrionário, redução na liberação de interferon-Tau com diminuição da capacidade de inibição da lise do CL e diminuição das taxas de concepção.

Analisando seus experimentos, Mann e Lamming (1999) também relataram a importância da P4 para a produção e a liberação de nutrientes além de fatores de crescimento no ambiente uterino, fundamentais para o desenvolvimento embrionário.

Em outro trabalho, Diskin e Morris (2008) relataram taxas de natalidade em torno de 55%, destacando que a maioria das perdas embrionárias ocorrem entre os dias 8 e 16 após a inseminação.

Pugliesi et al. (2014) em experimento com vacas de corte observaram efeitos positivos, com a elevação nos níveis circulantes de P4 por ≥ 3 dias, em animais com baixo escore corporal suplementados com 300mg de P4 de longa ação, no terceiro dia após a IATF.

Apesar dos efeitos embriotróficos das concentrações aumentadas de P4, a administração de P4 durante o metaestro ou o diestro precoce, 1 a 3 dias após o cio, podem comprometer o desenvolvimento do CL (O'Hara et al. 2014). Indo de encontro com os achados de Stronge et. al. (2005) que identificou uma relação linear negativa entre a concentração de progesterona no leite no dia 4 e a sobrevivência dos embriões, e uma correlação positiva com a concentração de progesterona elevada no leite nos dias 5, 6 e 7.

Diante do exposto, suplementar artificialmente com P4 animais submetidos a protocolos de inseminação, entre a fase inicial do diestro e o período crítico do reconhecimento materno, pode eventualmente promover alterações morfofisiológicas no corpo lúteo, com potencial favorecimento na diminuição de perdas embrionárias e consequente promoção de melhores taxas de concepção em animais de alta produtividade.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos da pesquisa foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Comitê Brasileiro de Ética, Bioética e Cuidado Animal (CEBEA), e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Licença de número 107/2019.

Local do estudo

O experimento foi realizado na Estação Experimental de São Bento do Una, pertencente ao Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, localizada no município de São Bento do Una, estado de Pernambuco, Brasil (8°31'36" S e 36°27'36" O).

Animais

Foram utilizadas fêmeas da raça Holandesa, sendo 16 novilhas, com idade média 17 ± 3 meses, pesando 345 ± 52 kg e 34 vacas em lactação, com idade média 65 ± 21 meses, pesando 674 ± 76 kg e média $227,8 \pm 127,2$ dias em lactação (DEL). Todas as fêmeas apresentavam escore dentro do intervalo de 2,0 a 3,5, na escala de 1 a 5 proposta por Edmonson et al. (1989). Os animais foram mantidos sob manejo semi-intensivo, com acesso à pastagem de capim Buffel (*Cenchrus ciliaris*), suplementadas com volumoso composto por

cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) e palma forrageira (*Napolea cochenifera*) triturados, e concentrado com 24% PB, além de suplementação mineral e água *ad libitum*.

Protocolo de sincronização do estro

Todas as fêmeas foram previamente submetidas a exames ginecológicos e ultrassonográficos. Para a sincronização do estro e da ovulação foram utilizados implantes intravaginais contendo 1g de progesterona (P4, Sincrogest[®] - Ourofino), concomitante com a administração de 2,0 mg de Benzoato de Estradiol por via intramuscular (i.m.; BE, Gonadio1[®] - ZOETIS) no início do protocolo, dez dias antes da previsão da IATF (D-10). Sete dias após (D-3), foram administrados via i.m., 0,15 mg (novilhas) ou 0,30 mg (vacas) de PGF2 α (D-cloprostenol, Luteglan[®] – CEVA) e 200 UI (novilhas) ou 500 UI (vacas) de gonadotrofina coriônica equina (eCG, FOLLIGON[®] – MDS Saúde Animal). No dia seguinte (D-2), foram retirados os implantes de P4. No (D-1) foi administrado 1,0 mg i.m. de BE em todos os animais. No dia seguinte (D0) todos os animais foram submetidos a IATF (Figura 1).

Delineamento experimental

No experimento 1, sete dias após a IATF, fêmeas nulíparas da raça Holandesa foram aleatoriamente divididas em dois tratamentos: controle, NC (n = 7) e tratamento, NT300 (n = 9). No grupo tratamento as novilhas receberam 300 mg de progesterona injetável de longa ação (P4, P4300[®] - Botupharma), e no grupo controle foi administrado solução salina como placebo.

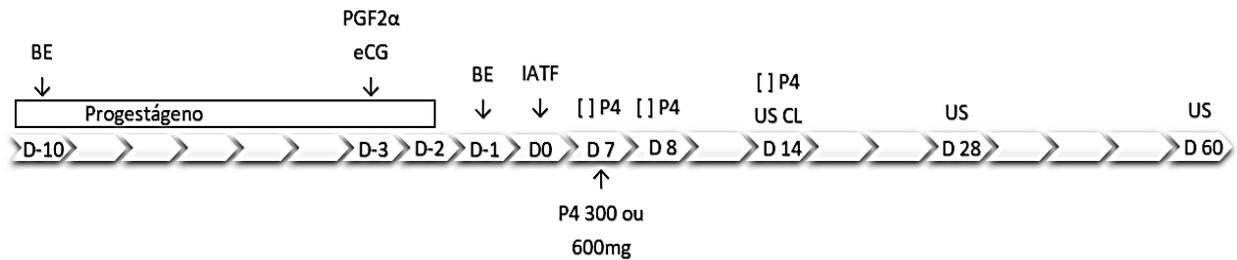
No experimento 2, sete dias após a IATF, fêmeas multíparas foram aleatoriamente divididas em três tratamentos: vacas grupo controle, receberam solução salina como placebo (VC; n = 13); vacas grupo tratamento suplementadas com 300 mg de P4300 (VT300; n = 11); e vacas grupo tratamento suplementadas com 600 mg de P4300 (VT600; n = 10).

Amostras de sangue

Todos os animais submetidos ao experimento tiveram amostras de sangue coletadas por punção venosa dos vasos coccígeos em tubos de 4,5 mL contendo K3 EDTA (Vacutainer Systems; Becton Dickinson, São Paulo, SP, Brasil), nos dias 7, 8 e 14 após a IATF (Figura 1). Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 1.000 \times g por 11 min e o soro recuperado,

transferido para microtubos de 1,5 mL e armazenado a -20°C até a realização dos ensaios hormonais.

Figura 1 - Diagrama de atividades dos experimentos. Protocolo de sincronização da ovulação, iniciado no dia (D-10) e finalizado no (D0) com a IATF; suplementação com progesterona, no 7º dia após, apenas nos animais dos grupos tratamentos, NT300, VT300 e VT600. Exames programados, ([] P4) coleta de amostra de sangue para dosagem de P4 nos dias 7, 8 e 14, (US CL) avaliação ultrassonográfica do Corpo Lúteo no dia 14 e (US) diagnóstico de gestação por ultrassonográfica nos dias 28 e 60. (BE), benzoato de estradiol; (PGF2 α), prostaglandina; (eCG), gonadotrofina coriônica equina.



As análises hormonais foram realizadas no Laboratório de Química Analítica do Centro de Apoio a Pesquisa (CENAPESQ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco. No momento das análises, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e homogeneizadas em um vórtex. Posteriormente, cada amostra foi introduzida em cubetas individualizadas de acordo com o funcionamento do aparelho de análise (Access2 - Beckman Coulter) e analisadas pelo método de eletroquimioluminescência, utilizando kit comercial para análise de P4 (Access Progesterone, Beckman Coulter), conforme recomendado pelo fabricante e considerando a linearidade do teste de 0,01-100 ng/mL. Foi realizado apenas um único ensaio para o processamento de todas as amostras, e o coeficiente de variação obtido intra-ensaio foi de 3,42%.

Exames ultrassonográficos e processamento das imagens

Para identificação, mensuração e avaliação do fluxo sanguíneo do CL no dia 14 (D14), foram realizados exames ultrassonográficos por via transretal, empregando aparelho portátil de ultrassom de modo B com transdutor retal e modo de mapeamento Doppler de fluxo colorido, com arranjo linear ajustado para 6,0 MHz (Mindray® M5). Durante o exame, foram realizadas varreduras dos ovários de todos os animais incluídos no estudo, para a obtenção de imagens estáticas em modo B e pequenos filmes em modo Doppler do CL. Após as gravações os cliques foram avaliados por um único operador, para seleção das imagens com as melhores resoluções conforme descrito por Guinter (2007). Em seguida todas as imagens

foram digitalizadas e salvas em arquivos para posteriores análises. Todos os exames foram realizados com as mesmas configurações do ultrassom, de forma padronizada e idêntica, tomando-se o cuidado para localizar toda a seção do CL dentro da caixa de amostra Doppler para evitar artefatos flash e avaliar a área máxima de fluxo sanguíneo no CL.

Para a análise das imagens e obtenção das mensurações da área do tecido lúteo (cm^2), volume (cm^3) e percentual da área do tecido luteal com fluxo sanguíneo, utilizou-se como recurso o software IMAGEJ (versão 1.51k, 2017), projetado especificamente para análise de imagens, habilitado a calcular a intensidade de brilho de cada pixel em uma determinada área da amostra (SCHNEIDER, 2012). O programa foi calibrado na escala de 77.7878 pixels/cm, tipificadas em RGB Colors, com o Color Threshold: Hue 170/255 e saturação em 1, possibilitando assim, um parâmetro semi-quantitativo para avaliação da imagem gerada do fluxo sanguíneo do tecido luteal. Em CL's com cavidade (intracavitários), a área transversal da cavidade foi avaliada separadamente e subtraída da área total.

Figura 2 – Imagem ultrassonográfica com Doppler de corte transversal de um CL bovino no 14º dia do ciclo estral.

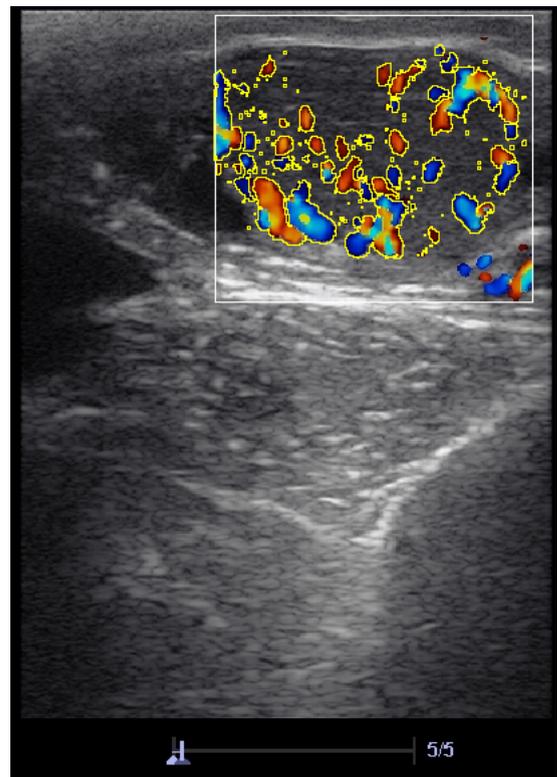
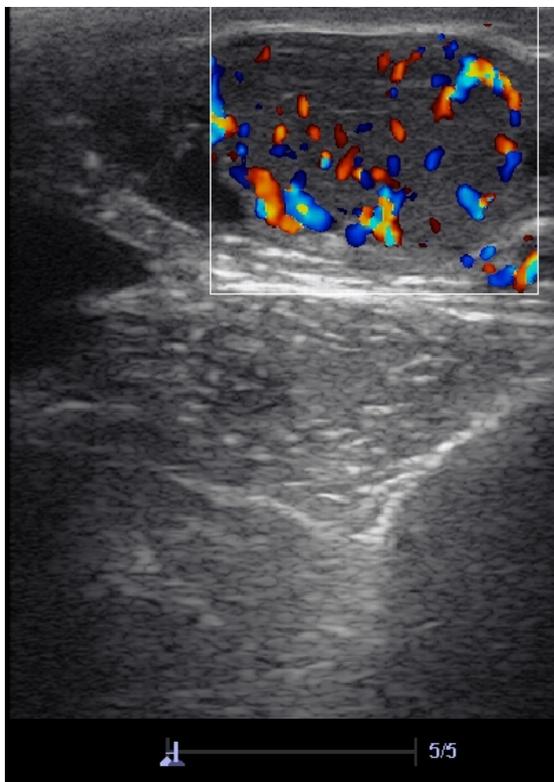


Figura 3 – Edição de imagem ultrassonográfica com software IMAGEJ® para mensuração da área do fluxo sanguíneo.

Exames ultrassonográficos também foram realizados nos dias 28 e 60 após a IATF. As vacas com vesículas embrionárias no dia 28, foram diagnosticadas como prenhes. E, posteriormente, todas as vacas foram reexaminadas no dia 60 do tratamento para identificar possíveis perdas embrionárias durante o período.

Análise estatística

Para análise dos dados utilizou-se o procedimento GLIMMIX do SAS versão 9.4 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC). Para análise das variáveis contínuas, tais como área, volume e fluxo sanguíneo do corpo lúteo, foi ajustado para distribuição Gaussiana e a função “identify”. As variáveis foram analisadas por meio de um modelo matemático que incluiu efeito fixo de tratamento e aleatório de réplica. O método Kenward-Roger foi utilizado para calcular os denominadores graus de liberdade para aproximar os testes F nos modelos mistos. Para análise das concentrações circulantes de progesterona foi utilizado o procedimento GLIMMIX do SAS ajustando-se para distribuição Gaussiana e a função “identify”. As variáveis foram analisadas por meio de um modelo matemático que incluiu efeito fixo de tratamento, de tempo e da interação tratamento e tempo, utilizando efeito aleatório de réplica. Para os dados binomiais, taxa de concepção aos 28 e 60 dias foi utilizado o procedimento GLIMMIX do SAS ajustando-se para distribuição Binomial. Estas variáveis foram analisadas por meio de um modelo matemático que incluiu efeito fixo de tratamento e o efeito aleatório de réplica. O método Residual foi utilizado para calcular os denominadores graus de liberdade para aproximar os testes F nos modelos mistos. A análise de correlação de Pearson entre as concentrações circulantes de progesterona nos dias 7, 8 e 14, assim como a área, volume e fluxo sanguíneo do corpo lúteo foi realizada através do procedimento CORR do SAS.

Todas as comparações estatísticas foram feitas utilizando médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos. Todos os resultados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (SEM). O nível de significância adotado foi $P \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) quanto a área, o volume e o fluxo sanguíneo do CL, entre os grupos de novilhas tratadas (NT; 300 mg/P4) e as novilhas do grupo controle (NC) (Tabela 1).

Também não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) quanto a área, o volume e o fluxo sanguíneo do CL, entre os grupos de vacas submetidas aos tratamentos VT300 e VT600, com os animais do grupo controle (Tabela 2).

Tabela 1 - Área, volume e fluxo sanguíneo do CL no dia 14 após a IATF em Novilhas Holandesas.

	Controle (n = 7)	300 mg (n = 9)	Valor de P
Área (cm ²)	3,400 ± 0,469	3,416 ± 0,407	0,979
Volume (cm ³)	5,642 ± 0,98	4,975 ± 0,849	0,616
Fluxo sanguíneo (%)	12,3 ± 4,5	11,6 ± 3,8	0,903

Tabela 2 - Área, volume e fluxo sanguíneo do CL no dia 14 após a IATF em Vacas Holandesas.

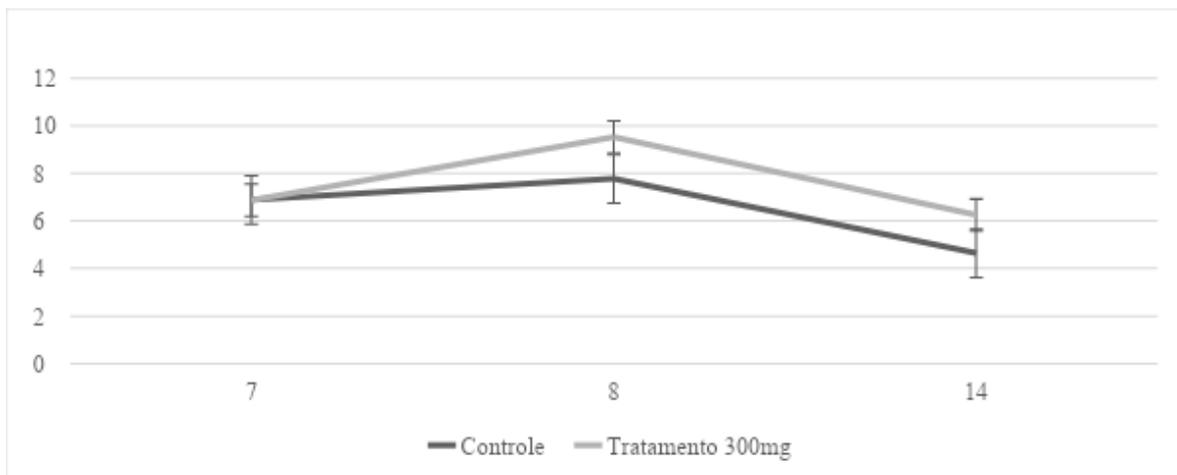
	Controle (n = 13)	300 mg (n = 11)	600 mg (n=10)	Valor de P
Área (cm ²)	3,808 ± 0,500	3,214 ± 0,370	3,925 ± 0,867	0,558
Volume (cm ³)	6,101 ± 1,157	5,106 ± 0,855	6,193 ± 2,005	0,745
Fluxo sanguíneo (%)	13,6 ± 3,7	12,1 ± 2,8	11,1 ± 6,5	0,925

O presente estudo não foi capaz de identificar e associar os efeitos da suplementação de P4 mencionados por Acosta e Myamoto (2004), em nenhum dos experimentos (novilhas e vacas), quanto a sua área e volume, durante a fase estática do CL no 14º dia após a IATF. Também não conseguimos obter diferenças estatísticas ($P > 0,05$) quanto a comparação das avaliações do fluxo sanguíneo entre os animais submetidos aos tratamentos e seus respectivos grupos controles, independente das concentrações suplementadas ou categoria, novilhas ou vacas (Tabelas 1 e 2).

Quanto às concentrações de P4 médias obtidas pelo método de eletroquimioluminescência, foram identificados elevações nos níveis plasmáticos de todos os animais entre o 7º e o 8º dia após a IATF independente do grupo ou tratamento aos quais foram submetidos, ressaltando os dados obtidos oriundos dos animais submetidos às suplementações propostas pelo trabalho, onde foram observados maiores incrementos nas concentrações plasmáticas de P4 neste período, quando comparados aos dados obtidos dos seus respectivos controles. Convergindo com os achados de Beltiman et al., (2009) quanto a eficiência da administração exógena de P4 em elevar suas concentrações circulantes.

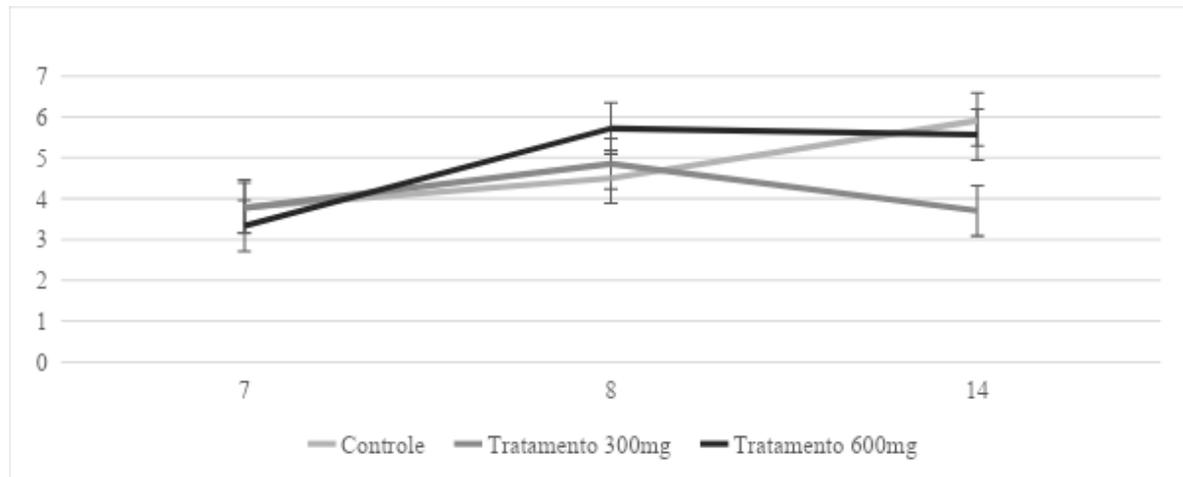
No experimento 1, com as novilhas, foram encontrados incrementos de 12,9% na P4 no grupo controle (NC: $7,77 - 6,88 = 0,89\text{ng/mL}$) e de 38,5% no grupo suplementado com 300mg (NT300: $9,51 - 6,87 = 2,64\text{ng/mL}$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Concentrações de P4 em Novilhas Holandesas, grupos controle e tratamento com 300mg, nos dias 7, 8 e 14 após IATF.



No experimento 2, com as vacas em lactação, encontramos elevações nas concentrações de P4, de 18,9% no grupo controle (VC: $4,50 - 3,78 = 0,71\text{ng/mL}$), de 28,6% no tratamento com 300mg (VCT300: $4,85 - 3,77 = 1,08\text{ng/mL}$) e de 71,3% no tratamento com 600mg (VCT600: $5,71 - 3,33 = 2,38\text{ng/mL}$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Concentrações de P4 em Vacas em Lactação, grupos controle e tratamento com 300mg e 600mg, nos dias 7, 8 e 14 após IATF.



Tais achados são compatíveis com o crescimento do CL em sua fase de desenvolvimento (BADINGA et al., 1994) e com a associação da P4 exógena das suplementações nos tratamentos preconizados.

Quando comparadas as análises das concentrações de P4 entre o 8º e o 14º dia, encontramos no experimento com as novilhas reduções nas concentrações em ambos os grupos, 40,3% no controle (NC: 4,64 – 7,77 = -3,13ng/mL) e 34,3% no tratamento (NT300: 6,24 – 9,51 = -3,27ng/mL). No experimento com as vacas, durante o mesmo intervalo, encontramos elevações nos níveis de P4 no grupo controle de 31,2% (VC: 5,90 - 4,50 = 1,41ng/mL) e diminuições nos grupos tratamentos, de 23,7% (VT300: 3,70 – 4,85 = -1,15ng/mL) e 2,62% (VT600: 5,56 – 5,71 = -0,15ng/mL) nas vacas suplementadas com 300 e 600mg de P4, respectivamente. Sugerindo desta forma, que animais suplementados com P4 no experimento 1 (novilhas), tiveram metabolizada a P4 exógena entre o 8º e 14º dia, mas foram capazes de assegurar níveis endógenos suficientes para a manutenção de suas prenhez. No entanto, os níveis de P4 apresentados no 14º dia após a IATF, nos grupos tratamento do experimento 2, VT300: 3,70±0,61ng/mL e VT600: 5,56±0,62ng/mL, foram inferiores a níveis preconizados como ótimos (>12,0ng/mL) para a sobrevivência embrionária, tendo-se em conta o período e a categoria de animais de acordo com Battocchio et al, (1999). Também podemos inferir que a suplementação com 600mg de P4 possa ter promovido uma regressão precoce do CL (O'HARA et al., 2014). Entretanto, não foram

verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos, independentemente de suas categorias e tratamentos.

Com os diagnósticos ultrassonográficos para reconhecimento da prenhez, realizados aos 28 e 60 dias, obtivemos taxas de concepção nos animais dos grupos controle (NC: $57,1 \pm 18,7\%$) e (VC: $61,5 \pm 13,4\%$) em ambos experimentos, condizentes com trabalhos publicados na área (SILVA et al., 2014). A TC obtida com as novilhas submetidas aos tratamentos (NT300: $55,5 \pm 16,5\%$) foi semelhante a encontrada no grupo controle, mas não se observou diferença estatística entre elas ($P > 0,05$). Quando avaliamos o experimento com as vacas, em seus tratamentos, observou-se reduções significativas nas TC (VT300: $36,3 \pm 14,5\%$) e (VT600: $30,0 \pm 14,5\%$), indicando resultados insatisfatórios com esse tratamento em seu índice reprodutivo.

Tabela 3 – Taxa de concepção entre os dias 28 e 60 após IATF, nas Novilhas submetidas aos tratamentos.

	Controle (n = 7)	300 mg (n = 9)	Valor de <i>P</i>
Prenhez/IA			
D-28 US*	$57,1 \pm 18,7$ (4/7)	$55,5 \pm 16,5$ (5/9)	0,950
D-60 US*	$57,1 \pm 18,7$ (4/7)	$55,5 \pm 16,5$ (5/9)	0,950

* Diagnósticos de gestação realizados através de exame ultrassonográfico.

Tabela 4 - Taxa de concepção entre os dias 28 e 60 após IATF, das Vacas submetidas aos tratamentos.

	Controle (n = 13)	300 mg (n = 11)	600 mg (n=10)	Valor de <i>P</i>
Prenhez/IA				
D-28 US*	$61,5 \pm 13,4$ (8/13)	$36,3 \pm 14,5$ (4/11)	$30,0 \pm 14,5$ (3/10)	0,289
D-60 US*	$53,8 \pm 13,8$ (7/13)	$36,3 \pm 14,5$ (4/11)	$20,0 \pm 12,6$ (2/10)	0,285

* Diagnósticos de gestação realizados através de exame ultrassonográfico.

Na avaliação das perdas embrionárias, ocorridas entre os dias 28 e 60 após a IATF, foi registrada apenas nos animais do experimento 2, nos grupos controle VC (n=1) e tratamento com 600mg de P4 VT600 (n=1), com respectivamente 7,7% e 10% de perda embrionária. Corroborando com os resultados observados por Silke et al., 2001 e Horan et al., (2004).

A mortalidade embrionária tardia é numericamente muito menor do que a perda precoce, mas, no entanto, causa sérias perdas econômicas aos produtores, porque muitas vezes prolongam ainda mais o retorno destes animais a reprodução.

CONCLUSÕES

A suplementação de P4 no dia 7 após IATF, não exerceu influência estatística sobre os parâmetros morfofisiológicos de área, volume e fluxo sanguíneo do CL. Os animais submetidos aos tratamentos com P4, apresentaram elevações em seus níveis plasmáticos do hormônio esteroide, mas não foram suficientes para que pudéssemos correlacionar a melhorias na taxa de concepção aos 28 e 60 dias após a IATF em novilhas e vacas Holandesas. Contudo, vale ressaltar os resultados obtidos com os exames ultrassonográficos entre o 28° e o 60° dia de gestação, onde os animais submetidos aos tratamentos com suplementação de P4 na dose de 300mg, tanto no experimento com novilhas quanto com o realizado com as vacas em lactação, não foram detectadas perdas embrionárias em seus diagnósticos, sinalizando um potencial efeito neste parâmetro quando os animais foram suplementados com esta dose.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animals Reproduction Science**, v. 82–83, p. 127–140, 2004.

ADEYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in Bos Taurus and Bos indicus heifers. **Theriogenology**, New York, v. 14, n. 6, p. 411-420, 1980.

ARNDT, W. J.; HOLLE, A. J.; BAUER, M. L.; KIRSCH, J. D.; SCHIMEK, D. E.; ODDE, K. G.; VONNAHME, K. A. Effect of post-insemination progesterone supplementation on pregnancy rate in dairy cows. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 4, p. 271–274, 2009.

BADINGA, L.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J.; MORRIS, G.; ENTWISTLE, K.; WOLFENSOR, D. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol 17-beta, progesterone and luteinizing hormone in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, New York, v. 42, n. 8, p. 1263-1274, 1994.

BARATTA, M.; GRASSELLI, F.; TAMANINI, C. Effects of gonadal steroids on tonic luteinizing hormone (LH) release and luteinizing hormone-releasing hormone-induced LH release from bovine pituitary cells cultured in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 1320–1327, 1994.

BATTOCCHIO, M.; GABAI, G.; MOLLO, A.; VERONESI, MC.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. **Theriogenology**, v. 51, p. 1059-1069, 1999.

BAZER, F. W.; KIM, J; SONG, G; KA, H; TEKWE, C. D.; WU, G. Select nutrients, progesterone, and interferon tau affect conceptus metabolism and development. **Annals of The New York Academy of Sciences**. Issue: Nutrition and Physical Activity in Aging, Obesity, and Cancer, 2012.

BELTMAN, M.E.; ROCHE, J.F.; LONERGAN, P.; FORDE, N.; CROWE, M.A. Evaluation of models to induce low progesterone during the early luteal phase in cattle. **Theriogenology**, v. 72, p. 986–992, 2009.

BRONSON, A.; EDWARDS, T. Management of pregnant heifers in the feedlot. *In*: **Proceedings of the Academy of Veterinary Consultants**. Canada: Calgary, 2008. p. 27–38.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C. O.; KENNY, D. A.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 3, p. 368-375, 2008.

CARTER, F.; RINGS, F.; MAMO, S.; HOLKER, M.; KUZMANY, A.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; MEHTA, J. P.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K.; LONERGAN, P. 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**, v. 83, n. 5, p. 707-719, 2010.

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

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, s. 2, p. 260–267, 2008.

EDMONSON, A. J., I. J.; LEAN, L. D.; WEAVER, T. F.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p 68–78, 1989.

FORDE, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C. O.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; McBRIDE, R.; BOLAND, M. P.; O'GAORA, P.; LONERGAN, P.; ROCHE, J. F. Progesterone-Regulated Changes in Endometrial Gene Expression Contribute to Advanced Conceptus Development in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 784-794, 2009.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; DUFFY, G. B.; DUFFY, P.; MEHTA, J. P.; O'GAORA, P.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; CROWE, M. A. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. **Biology of Reproduction**, v. 84, p. 266–278, 2011.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography**. Editor Equiservices Publishing, Cross Plains, WI, 2007.

HAFEZ, B. e HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in Farm Animals**. Baltimore, ed 7, 2000.

HERZOG, K.; BROCKHAN-LUDEMANN, M.; KASKE, M.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v. 73, p.691–697, 2010.

HORAN, B.; MEE, JF.; RATH, M.; O'CONNOR, P.; DILLON, P. The effect of strain of Holstein–Friesian cow and feeding system on reproductive performance in seasonal-calving milk production systems. **Animal Science**, v. 79, p. 453–467, 2004.

HOWARD, J. M.; MANZO, R.; DALTON, J. C.; FRAGO, F.; AHMADZADEH, A. Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 95, p. 224–233, 2006.

JOHNSON, K. R.; ROSS, R. H.; FOURT, D. L. Effect of progesterone administration on reproductive efficiency. **Journal Animal Science**, v. 17, p.386-90, 1958.

LARSON, S. F.; BUTLER, W. R.; CURRIE, W. B. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p.1288–95, 1997.

MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M. A.; BARBOSA, R. T.; DE OLIVEIRA, C. A.; BINELLI, M. Ovarian function in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows after post-ovulation hormonal treatments. **Theriogenology**, v. 69, p. 798–804, 2008.

MAILLO, V.; DUFFY, P.; O'HARA, L.; DE FRUTOS, C.; KELLY, A. K.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. C. Effect of hCG administration during corpus luteum establishment on subsequent corpus luteum development and circulating progesterone concentrations in beef heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, p. 367-374, 2013.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, p. 269-274, 1999.

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

MEHNI, S. B.; SHABANKAREH, H. K.; KAZEMI-BONCHENARI, M.; EGHBALI, M. The comparison of treating Holstein dairy cows with progesterone, CIDR and GnRH after insemination on serum progesterone and pregnancy rates. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 1, p. 131-134, 2012.

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

O'HARA, L.; FORDE, N.; CARTER, F.; RIZOS, D.; MAILLO, V.; EALY, A. D.; KELLY, A. K.; RODRIGUEZ, P.; ISAKA, N.; EVANS, A. C. O.; LONERGAN, P. Paradoxical effect of supplementary progesterone between Day 3 and Day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v. 26, p. 328-336, 2014.

OSMAN, E.; EROL, A. Progesterone concentration of pregnant repeat breeder cows following post insemination Prid and GnRH treatments. **Journal Lucrari Stiintifice**, v. 55, p. 315-318, 2011.

PARR, M. H.; MULLEN, M.P.; CROWE, M. A.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Relationship between pregnancy per artificial insemination and early luteal concentrations of progesterone and establishment of repeatability estimates for these traits in Holstein-Friesian heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 2390-2396, 2012.

PUGLIESI, G.; OLIVEIRA, M. L.; SCOLARI, S.C.; LOPES, E.; PINAFFI, F.V.; MIAGAWA, B. T.; PAIVA, N. Y.; MAIO, J. R. G.; NOGUEIRA, G. P.; BINELLI, M. Corpus Luteum Development and Function after Supplementation of Long-Acting Progesterone During the Early Luteal Phase in Beef Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p. 85-91, 2014.

RIVERA, H.; LOPEZ, H.; FRICKE, P. M. Fertility of Holstein dairy heifers after synchronization of ovulation and timed AI after removed tail chalk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2051–2061, 2004.

ROSSETTI, R. C.; PERDIGÃO, A.; MESQUITA, F. S.; SÁ FILHO, M.; NOGUEIRA, G. P.; MACHADO, R.; MEMBRIVE, C. M.; BINELLI, M. Effects of flunixin meglumine, recombinant bovine somatotropin and/or human chorionic gonadotropin on pregnancy rates in Nelore cows. **Theriogenology**, v. 76, p. 751–758, 2011.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle, An overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 241–251, 2004.

SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9 (7), p. 671–675, 2012.

SHELTON, K.; GAYERIE DE ABREU, M. F.; HUNTER, M. G.; PARKINSON, T. J.; LAMMING, G. E. Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. **Journals of Reproduction e Fertility**, v. 90, p. 1–10, 1990.

SINGH, J.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. **Animals Reproduction Science**, v. 78, p. 371–399, 2003.

SILKE, V.; DISKIN, M. G.; KENNY, D. A.; BOLAND, M. P.; DILLON, P.; MEE, J. F.; SREENAN, J. M. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. **Animals Reproduction Science**, v. 15, p. 1–12, 2001.

STARBUCK, G. R.; DARWASH, A. O.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The detection and treatment of post-insemination progesterone insufficiency in dairy cows. Fertility in the high-producing dairy cow. **Brit Soc. Animals Science, Occasional Publication**; v. 26, p. 447–450, 2001.

STEVENSON, J. S.; PORTALUPPI, M. A.; TENHOUSE, D. E.; LLOYD, A.; EBORN, D. R.; KACUBA, S.; DEJARNETTE, J. M. Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 331–340, 2007.

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

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. Dukes - **Fisiologia dos animais domésticos**. 11° ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 902, 1996.

VERONESI, M. C.; GABAI, G.; BATTOCCHIO, M.; MOLLO, A.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Ultrasonographic appearance of tissue is a better indicator of CL function than CL diameter measurement in dairy cows. **Theriogenology**, v. 8, p.58-61, 2002.

WILTBANK, J. N.; HAWK, H. W.; KIDDER, H. E.; BLACK, W. G.; ULBERG, L. C.; CASIDA, L. E. Effect of progesterone therapy on embryos survival in cows of lowered fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 39, p 546-61, 1956.

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

WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; CUNHA, A. P.; GIORDANO, J. O.; FRICKE, P. M.; BAEZ, G. M. and DISKIN, M. G. Efeitos fisiológicos e práticos da progesterona na reprodução em gado leiteiro. **Animal**, v. 8, s1, p. 70–81, 2014.