



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL

**“AVALIAÇÕES DE PROTOCOLOS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL POR TEMPO
FIXO EM VACAS MESTICAS SOB EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO CRIADAS
NO SEMIÁRIDO NORDESTINO”**

JOSÉ MARIA FREIRE DE MEDEIROS

MOSSORÓ/RN-BRASIL

2013

JOSÉ MARIA FREIRE DE MEDEIROS

**“AVALIAÇÕES DE PROTOCOLOS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL POR TEMPO
FIXO EM VACAS MESTICAS SOB EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO CRIADAS
NO SEMIÁRIDO NORDESTINO”**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL
DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO
SEMIÁRIDO, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM PRODUÇÃO ANIMAL.

ORIENTADOR: Prof. D.Sc LUIS AUGUSTO CORDEIRO

MOSSORÓ-RN

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)
Setor de Informação e Referência

M963a Medeiros, José Maria Freire de.

Avaliações de protocolos de inseminação artificial por tempo fixo em vacas mestiças sob efeito do estresse térmico criadas no Semiárido Nordestino./ José Maria Freire de Medeiros -- Mossoró, 2014.

61f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Vieira Cordeiro

Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pós-Graduação.

1. Bovinos - Estresse térmico. 2. Reprodução de bovinos.
3. Protocolo hormonais. I. Título.

RN/UFERSA/BCOT /008-14

CDD: 636.2089

Bibliotecária: Vanessa Christiane Alves de Souza Borba
CRB-15/452

JOSÉ MARIA FREIRE DE MEDEIROS

**“AVALIAÇÕES DE PROTOCOLOS DE IATF EM VACAS MESTICAS SOB EFEITO
DO ESTRESSE TÉRMICO CRIADAS NO SEMÁRIDO NORDESTINO”**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL
DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO
SEMIÁRIDO, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM PRODUÇÃO ANIMAL.

APROVADO : 18 / 12 / 2013

BANCA EXAMINADORA:



Prof. D.Sc. Luiz Augusto Vieira Cordeiro
Orientador

Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte
Prof. D.Sc. Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte
Examinadora

Valesca Barreto Luz
Prof. D.Sc. Valesca Barreto Luz
Examinadora

Dedico este trabalho à minha avó Olímpia Martins Freire e meu avô Antônio Santana (in Memoriam). Porto seguro em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre guiar meus passos e por me dar forças e colocar no meu caminho pessoas realmente especiais que me fizeram conseguir e manter firme nessa constante caminhada.

A meus pais, Antônio Batista de Medeiros e Ana Oliveira Freire, por me dar condições de estudar e me mostrar o caminho à percorrer.

A minhas irmãs Andreia Paula e Ana Angélica por me motivar a estudar e enfrentar os desafios da vida.

À minha esposa Kalyana karline, pelo apoio e compreensão ao longo desses anos

Aos meus tios..e tias, em especial a tio Raimundo por ser um homem bom e paciente, Me motivando a ser.

A todos os meus primos, com ênfase: Emanuel e Huminho

À todos os meus familiares.....

À minha outra família: José Victor e Janice; aos meus cunhados: Vinícius, Karla e Vaguinho. Além dos Tios, tias, primos e primas dessa outra família.

Ao meu grande amigo e companheiro Heider Irinaldo, por mim mostrar força em todos os momentos

Ao meu orientador Dr. Luiz Augusto, pelo incentivo, confiança, cordialidade e ensinamento ao longo do mestrado.

A Prof(a) Ms. Priscila Bertevello pela ajuda nesse trabalho, onde, colaborou de forma muito especial.

À meu amigo e professor Ms.: Leonardo Lelis pelos ensinamento, paciência e companheirismo.

A minha banca Dra. Aracely Ricarte e Dra. Valeska Luz pela atenção e compreensão

A todos os colegas do mestrado, Ocelio, Ageu, Susana, Luciana, Marcone, Janeto, Diego, Wilma, Liliane e Ruth, mantiveram unidos e prestativos por todo esse tempo.

Agradeço a todos os professores do PPG em Produção animal pelos ensinamentos, em especial, ao Alexandre Paula Braga, Luís Aroeira e, Liz Carolina, que foram sempre muito prestativos.

Ao proprietário da fazendas flor da serra, o Sr Luizinho Girão. Aos funcionários Alex, Barreto e a todos contribuirão nesse trabalho.

Muito Obrigado.

ABREVIATURAS

ET – Estresse térmico

MS – matéria seca

°C - Temperatura em graus célsius

TCI – Temperatura critica inferior

TCS – Temperatura critica superior

LH – Hormônio luteinizante

I.A – Inseminação artificial

I.A.T.F – Inseminação artificial em tempo fixo

PGF₂ α – Prostaglandina

GnRH - hormônio liberador de gonadotrofina

P4 – progesterona

e CG – *gonadotrofina coriônica equina*

(P/IA) - índices na relação prenhes /inseminação artificial

CL - corpo lúteo

Tr - Temperatura retal

TA – Temperatura do ar

UR – Umidade relativa

TRM – Temperatura radiante media

FR – Frequência respiratória

TABELAS

Tabela 1---Tratamentos de IATF realizados no mês de março de 2013	24
Tabela 2. Grupos de tratamentos, prenhes e proporção(%)	30

GRÁFICOS

Gráfico 01. Temperatura retal (°C) dos animais expostos aos tratamento de IATF entre os dias 15 a 27 de março de 2013	27
Gráfico 2: Relação da umidade relativa média máxima e mínima e função dos dias em que ocorreram o experimento	28
Gráfico 3: Relação da temperatura do ar média, máxima e mínima e função dos dias em que ocorreram o experimento	29
Gráfico 4: Temperatura do ar, temperatura radiante média e CTR média em todas as horas e todos os dias de experimento.....	29

SUMÁRIO

CAPITULO I – REFERENCIAL TEÓRICO	12
1.1. ESTRESSE TÉRMICO E A REPRODUÇÃO	12
1.2. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO.....	14
CAPITULO II – AVALIAÇÕES DE PROTOCOLO DE IATF EM VACAS MISTIÇAS SOB EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO CRIADAS NO SEMIÁRIDO NORDESTINO	16
RESUMO.....	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. METODOLOGIA	21
2.1. LOCAL DA EXECUÇÃO	21
2.2. ANIMAIS UTILIZADOS	21
2.3. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO.....	22
2.3.1. VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS	22
2.3.2. PARÂMETROS METEOROLÓGICOS	22
2.3.3. PROTOCOLOS HORMONAIS	23
2.4. ANÁLISE ESTADÍSTICO.....	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4. CONCLUSÃO	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
ANEXO I	41
ANEXO II	62

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1.1. ESTRESSE TÉRMICO E A REPRODUÇÃO

Em condições de estresse térmico, ocorre uma redução no consumo de alimentos, as vacas acabam entrando em balanço energético negativo mais acentuado. Este fato eleva a utilização de glicose pelas células, diminuindo sua utilização como fonte de energia para manutenção da produção de leite. Contudo, este processo implica sobre a fertilidade, pois o ovócito, o embrião e o feto utilizam a glicose como fonte de energia, e a taxa de clivagem e o desenvolvimento dos blastocistos são reduzidos quando mantidos em ambientes com baixo teor de glicose (BILBY et al., 2009).

O somatório das forças externas ao animal homeotérmico, desequilíbrio entre condições ambientais e animal que alteram a temperatura corporal do estado de repouso, ou seja, a condição de homeostase, pode ser definido como estresse térmico (ET). Fatores ambientais são os principais problemas que interferem na produção de leite, sobretudo em vacas de alta produção que necessitam de maior ingestão de alimentos e conseqüentemente maior produção de calor metabólico (PEGORER, 2006), portanto, com a evolução na produção de leite está associado o aumento da ingestão de matéria seca (MS), aumenta-se assim o calor metabólico para produção de leite e prejudica o balanço térmico em períodos de estresse. Esses fatores somados a altas temperaturas, alta umidade relativa do ar e radiação solar, provocam hipertermia ou até mesmo estresse térmico nos animais, que se caracteriza por qualquer combinação de condições ambientais que deixem a temperatura ambiente maior que a zona de termoneutralidade do animal (THATCHER, 2010). Nos mamíferos é mantida dentro de estreitos limites, independente das variações ambientais de temperatura. Para a manutenção da temperatura dentro desses limites, o animal necessita regular a velocidade do ganho e da perda de calor (ROBINSON, 2004).

A atividade termorregulatória necessária para os homeotérmicos manterem em equilíbrio suas temperaturas corporais aumenta com a alteração das condições ambientais de temperatura para os extremos. Em condições moderadas a produção e a perda de calor estão em equilíbrio. Essa faixa é chamada de zona de neutralidade térmica (RANDALL et al., 2000), na qual varia de acordo com a taxa

metabólica, e nas vacas leiteiras de alta produção leiteira está entre 4°C e 15°C para raças holandesas (ROBINSON, 2004).

Nos bovinos a zona de conforto para os animais é limitada pela temperatura crítica superior (TCS) e temperatura crítica inferior (TCI), sendo que abaixo da TCI os animais sofrem estresse pelo frio e acima da TCS sofrem estresse pelo calor (MARTELLO, 2006).

A quantidade de calor estressante, reage, inicialmente, promovendo uma vasodilatação periférica, aumentando o fluxo sanguíneo na pele e nos membros. Esta elevação no fluxo sanguíneo eleva a temperatura aumentando o gradiente térmico entre pele, membros e ambiente, resultando em maior perda de calor para o ambiente por radiação e por convecção (ROBINSON, 2004).

O ET reduz a intensidade e manifestação de estro (LUCY, 2001). Uma vaca possui estro com duração de aproximadamente 14 a 18 horas durante o período frio, já em períodos quentes possui duração de 8 a 10 horas, o que dificulta no diagnóstico de cio (BARBOSA & DAMASCENO, 2002).

Nos períodos mais quentes do ano, com maiores efeitos de ET sobre as vacas de leite, o índice de falha na detecção de estro chega a 75-80%, pois o calor reduz tanto a duração do estro quanto o número de montas. O estresse térmico pode ainda reduzir as taxas de concepção para 10% ou menos (HANSEN, 2007).

Guzeloglu et al. (2001), observaram uma diminuição nas concentrações de estradiol, não sendo observado o mesmo comportamento para a progesterona, que teve suas concentrações aumentadas em condições de estresse térmico. Os níveis de progesterona no plasma podem ser aumentados ou diminuídos dependendo do tipo de estresse térmico (agudo ou crônico) e do estado metabólico do animal. As mudanças endócrinas reduzem a atividade folicular e alteram o mecanismo ovulatório, levando ao decréscimo na qualidade do oócito e do embrião, além de serem responsáveis pela manutenção da gestação (Hansen, 2005). Dessa forma, baixas concentrações de progesterona na circulação de vacas podem comprometer a função reprodutiva e causar baixa fertilidade (THATCHER et al., 2001). Isso tem sido reportado pelo fato de se alterar a dinâmica folicular ovariana pela persistência do folículo dominante (WOLFENSON et al., 2002), o que ocorre mudanças na morfologia uterina e na secreção de PGF₂ α e reduzindo assim, a probabilidade de implantação do embrião (RENSIS e SCARAMUZZI, 2003).

LUCY (2001) relatou que os oócitos presentes no ovário sob ET são afetados por longos períodos de injúria. Os folículos são danificados pelo estresse, mas continuam crescendo, vindo a ovular oócitos subférteis durante vários meses após a diminuição do estresse calórico. Hánsen et al. (2001) sugeriram a hipótese de que os oócitos se comportem de maneira análoga as células germinativas do macho, as quais são sensíveis a temperaturas elevadas.

Os efeitos do estresse térmico agem sobre os folículos das vacas, que tendem a produzir oócitos de menor capacidade de fertilização, e caso haja a fertilização, os embriões passam a ter desenvolvimento anormal (HANSEN, 2007) onde o folículo dominante se desenvolve em um ambiente de baixas concentrações de LH, o que resulta em menor desenvolvimento folicular e diminuição da secreção de estradiol, levando a baixa expressão do estro e redução da fertilidade (RENSIS ET ALI., 2003).

As taxas de fertilização são maiores em novilhas do que em vacas de alta produção sob ET (Santos et al., 2004). Em seu estudo, Corassin (2004) observou que animais de primeira lactação apresentaram maior chance de sucesso ao primeiro serviço do que fêmeas pluríparas, e vacas cobertas no período de inverno apresentaram aproximadamente cinco vezes mais chances de concepção ao primeiro serviço pós-parto do que vacas cobertas no verão.

A taxa de prenhes é vulnerável devido à sensibilidade do ovócito e do espermatozoide no momento da inseminação, e à sensibilidade do embrião nos estágios iniciais do desenvolvimento, quando exposto a um aumento da temperatura corpórea. Quando a temperatura do útero no dia seguinte a inseminação encontra-se 0,5°C acima da média que é 38,3°C, a taxa de concepção cai 6,9%. Deste modo, uma temperatura uterina de 38,8°C está associada à queda na taxa de concepção (THATCHER, 2010).

1.2. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

A inseminação artificial (IA) é indispensável para o melhoramento genético e o aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos. De todas as biotécnicas aplicadas à reprodução animal, a I.A é a mais antiga, a mais simples e a de maior impacto na produção animal. Sendo, a biotecnica aplicada à reprodução animal em que o sêmen é depositado no aparelho reprodutivo da fêmea, com auxílio de

materiais e instrumento específicos, em condições que permitam obter a fecundação. Para facilitar o manejo em rebanhos numerosos, existem à disposição tratamentos hormonais ou protocolos para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) que torna possível a I.A das fêmeas, sem observações de estro (Gonçalves, 2008).

O desenvolvimento de protocolos para inseminação artificial em tempo fixo tornou possível evitar a necessidade de detecção de estro, bem como inseminar vacas em tempo fixo. O uso destes protocolos em vacas sob estresse térmico tem mostrado ser eficiente em aumentar a taxa de prenhez após o parto (HANSEN, 2005). Alguns estudos realizados têm mostrado uma melhora com o uso de protocolos de inseminação em torno de 8% em comparação ao método tradicional, por meio do qual é feita somente observação visual de estro (HANSEN, 2005).

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE IATF EM VACAS MESTICAS SOB EFEITO DO ESTRESSE TERMICO CRIADAS NO SEMI-ARIDO NORDESTINO

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE IATF EM VACAS MESTICAS SOB EFEITO DO ESTRESSE TERMICO CRIADAS NO SEMI-ARIDO NORDESTINO

Título do trabalho:

AVALIAÇÕES DE PROTOCOLOS DE IATF EM VACAS MESTICAS SOB EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO CRIADAS NO SEMIÁRIDO NORDESTINO

Normas da revista: Theriogenology

Página eletrônica da revista: <http://www.theriojournal.com/>

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE IATF EM VACAS MESTICAS SOB EFEITO DO ESTRESSE TERMICO CRIADAS NO SEMI-ARIDO NORDESTINO RESUMO

^a Medeiros, J.M.F.; Costa, L.L.M.; Bertevello, P.S.; ^a Cordeiro, L.A.V.

- a. Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-árido,

RESUMO

Dentre as biotécnicas da reprodução, a inseminação artificial é a que permite maior ganho zootécnico para o rebanho bovino leiteiro. A associação da inseminação com protocolos de indução do estro, que utilizam da manipulação endócrina dos animais por utilização de hormônios com o objetivo de indução do estro. A associação destes protocolos podem sincronizar o estro de um rebanho ou podem facilitar o manejo ou planejamento de uma propriedade programando a data de inseminação, daí advém o nome da biotécnica como inseminação artificial por tempo fixo (IATF). São muitos os protocolos encontrados na literatura, tendo cada um à sua particularidade e sua complexidade. O mais difundido protocolo é o Ovysinch, que associa os hormônios prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) e o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Deste foram desenvolvidos muitos outros protocolos os quais apresentam diferentes graus de sucesso, principalmente se os animais a serem tratados são de regiões de clima quente, como o semi árido brasileiro. A associação de altas temperaturas associada a baixa umidade é um fator de perdas econômicas atreladas aos baixos resultados em prenhes nas vacas. Desta forma, o objetivo deste trabalho é estudar o impacto do estresse térmico sobre protocolos de IATF na região semi-árida nordestina, especificamente na região cearense da Chapada do Apodi, em animais não confinados, manejados a pasto. Cinco grupos de 12 animais foram submetidos aos protocolos Progesterona e Gonadotrofina Coriônica Equina (P4+ eCG), Pré-Ovysinch associado ao Ovysinch, 7dCO-synch, Cosynch e a associação Progesterona com Cloproatenol sódico (P4+ Cloproatenol).

ABSTRACT

Between reproduction biotechniques, the artificial insemination is the one which allows a bigger gain zootecnican for the dairy cattle herd. The association of the insemination for induction of estrus protocols, which use the animals' endocrine manipulation by using the hormones aiming the induction of estrus. The association of this protocols might synchronize the estrus in a herd, or might easier the management or planning of a property, scheduling the insemination date, there is thus the biothechnique name as artificial insemination by fixed time (IATF). There are lots of protocols found on literature, each one having theirs particularities and complexities. The most widespread protocol is the Ovysinch, that associates the hormones prostaglandine ($PGF_{2\alpha}$) and gonadotrofines (GnRH) the releasing hormone. From this, were developed others protocols which presents different levels of success, especially if the animals to be treated are from hot climate regions, like the brazilian semi-arid. The assotiation of high temperatures and low humidity is a economic loss factor linked to low results on cow pregnancy. Thus, this work aims to study the thermic stress impact on IATF protocols on the semi-arid northeastern region, especially on the Apodi plateau, on confined animal, grazed on pasture. Five groups of 12 animals were submitted to the protocols. Progesterone and Equine Ganadtrofine Corionic (P4+ eCG), Pre-Ovysinch associated to the Ovysinch, 7dCO-synch, Cosynch and a association with Sodic Cloproatenol (P4+ Cloproatenol).

Key-Words: Termical stress. Reproduction. Bovine.

1. INTRODUÇÃO

O estresse térmico afeta negativamente em vários aspectos a produção leiteira, a diminuição da produção de leite e as perdas reprodutivas causam um impacto significativo no potencial econômico das granjas produtoras de leite. Este fato gera uma diminuição na produção leiteira devido à redução na ingestão de alimentos. Além da temperatura ambiente, a umidade relativa do ar elevada compromete a capacidade da vaca de dissipar calor para o ambiente influenciando diretamente na diminuição da produção. Estes fatores apresentam maior relevância em regiões de clima quente e seco como o semi-árido nordestino, uma região que ocupa uma área de 1.640.000 Km², correspondendo a 19,9 % do território nacional, quase integralmente localizada na região nordeste do Brasil

A sincronização de estro é uma importante ferramenta, já que pode viabilizar boa concentração dos partos no início da temporada de parição e no momento mais adequado quanto à disponibilidade de forragem nos sistemas de criação extensiva (Gonçalves et al, 2008) ou épocas de clima mais ameno. Assim a sincronização de estro é uma biotécnica reprodutiva capaz de manipular o ciclo estral através do uso de hormônios (MAPLETOFT et al., 2000), bem como por meios mecânicos como a aspiração folicular guiada por ultra-som (BURATINI, 2000), ou a cauterização de um folículo dominante ou supressão com fluido folicular bovino, livre de esteroides, (MAPLETOFT et al., 2000).

A indução de estro, tem por princípio retirar as fêmeas do anestro, também por emprego de hormônios ou práticas de manejo, sendo, desta forma, considerados processos aplicáveis a diferentes categorias de animais (MORAES et al., 2002). O método envolve a manipulação tanto da dinâmica folicular como luteal (MAPLETOFT et al., 2000). O primeiro é atingido com o uso de progesterona e ou progestágenos (substâncias estas similares à progesterona) e o segundo se faz pelo uso de prostaglandina e seus análogos (ácidos graxos com propriedades tipo hormonal).

O protocolo Ovsynch de sincronização do estro desenvolvido por Wolfenson (1994) e Pursley (1995) e seus colaboradores permite a inseminação em tempo préfixado, sem necessidade de observação do cio. O tratamento consiste da associação dos hormônios prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) e o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). O tratamento com GnRH induz uma descarga hipofisária de hormônio luteinizante (LH), seguida da ovulação ou regressão (atresia) de um

eventual folículo dominante, resultando na emergência de uma nova onda folicular nos dois a três dias seguintes à injeção do GnRH (Wolfenson et al., 1994; Pursley et al., 1995).

Prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), e seu análogos sintéticos Cloprostenol sódico, é uma substância luteolítica comumente usada nos protocolos de indução de estro e sincronização por induzir a regressão do corpo lúteo (CL) e posterior expressão do estro 3 a 5 dias após o tratamento (Inskoop 1973), porém sua eficiência é dependente da fase do ciclo estral em que o hormônio é administrado (Kastelic et al. 1990).

Uma das modificações mais simples do tratamento Ovsynch clássico é o denominado protocolo Co-Synch onde o GnRH é administrado concomitantemente com a IA (Small et al., 2000). Porém, este protocolo tem tido fracos resultados em vacas leiteiras, resultando baixo índice de prenhez (Pursley et al., 1997; Schmitt et al., 1996). A adição de implante de progesterona intravaginal (CIDR® ou similar) associado ao protocolo Ovsynch (Ambrose et al., 2008) ou no protocolo Co-synch (7Co-Synch) (Martínez et al., 2002) aumentaram os índices na relação prenhez /inseminação artificial (P/IA)

. Embora a maior parte das pesquisas que utilizaram o protocolo Co-Synch tenham se concentrado num intervalo de 48 horas entre a administração de prostaglandina e GnRH+IA, sugere-se que um intervalo de 60 a 64 horas após a PGF_{2α} (conforme usada no Ovsynch) estaria mais relacionado ao momento correto de inseminação para vacas de corte (GEARY ET AL., 2000; STEVENSON ET AL., 2000; DEJARNETTE ET L., 2001a) e de leite (DEJARNETTE ET AL., 2001b), sendo estes resultados apenas ligeiramente menores aos obtidos com o Ovsynch, com menor necessidade de manejo dos animais (DEJARNETTE ET AL., 2003).

O primeiro tratamento com GnRH no protocolo Co-synch tem por finalidade induzir a ovulação do folículo dominante (se presente) e a emergência de uma nova onda folicular com aproximadamente 2 dias (Macmillan & Thatcher, 1991; Twagiramungu et al., 1995; Martínez et al., 1999). Lamb e colaboradores (2006), utilizando em 2.075 matrizes de corte, observou que a associação de GnRH no início do protocolo 7Co-synch aumentou a relação P/IA mas em novilhas este ganho representou apenas 4% de ganho quando comparado aos animais que não receberam, de forma que sua utilização tem levantado questionamentos. No entanto, a indução de um corpo lúteo assessorio induzido pelo primeiro GnRH pode não

regredir após um único tratamento com PGF2 α em protocolos com pequeno intervalo entre as administrações de GnRH e PGF2 α , como acontece no protocolo 5dCosynch +PRID. Para aprimorar a regressão de um corpo lúteo induzido, dois tratamentos de PGF em intervalos de 12 h é recomendado nestes casos (Kasimanickam et al., 2009).

Como o grau de insucesso dos protocolos de IATF é muito alto nas regiões de estresse térmico, como é a realidade da região semiárida nordestina, onde acaba por induzir um descrédito às biotécnicas da reprodução pelos produtores destas localidades, este trabalho tem como objetivo testar os protocolos mais utilizados para vacas leiteiras sob as condições de estresse impostas nesta região.

2. METODOLOGIA

2.1. LOCAL DA EXECUÇÃO

Este trabalho foi executado na fazenda Flor da Serra, situada na chapada do Apodi, município de Limoeiro do Norte, a 198 km de Fortaleza-CE, estando entre as coordenadas geográficas 5°6'38" e 5°11'39" de latitude sul e a oeste entre os paralelos 37°52'21" e 37°56'05" de longitude. A temperatura anual da região varia de 22°C a 36°C. A propriedade possui um rebanho leiteiro de vacas mestiças 1/2, 3/8, 5/8, 3/4, e 7/8 holandesas sob manejo intensivo e semi-intensivo.

2.2. ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizadas 60 fêmeas novilhas bovinas mestiças. Os animais foram selecionados levando-se em conta o peso corporal entre 252 a 483 kg de peso vivo e a idade entre 2 a 4 anos e foi mantido em piquetes sem sombra, respeitando o manejo usual da propriedade. Cinco grupos experimentais, com 12 animais cada, foram homogeneamente constituídos e cada grupo recebeu um tratamento de inseminação artificial por tempo fixo (IATF) diferente, seguindo a tabela 01. Todos os grupos foram alimentados com volumoso em sistema de manejo com alternância de piquetes com capim Tifton 85, sal mineral e água *ad libitum*.

2.3. IATF

Previamente, todos os animais selecionados passaram por exame obstétrico por palpação retal para exclusão de animais prenhes. Todos os protocolos foram realizados entre os dias 16 e 26 de março de 2013, e tiveram início as 7:00 h e foram realizados pelo mesmo inseminador, gabaritado e residente na fazenda, durante todo o experimento.

Durante a manipulação dos animais para a realização dos protocolos, foram realizadas as coletas das variáveis fisiológicas e meteorológicas.

O diagnóstico de gestação feito por ultra-sonografia, 30 e 60 dias após a inseminação artificial (IA), utilizando aparelho Chison D600vet (Guangzhou Shihai Medical Equipment Co., Ltd., Guangdong, China) com sonda tranretal de 5,0 MHz.

2.3.1. Variáveis Fisiológicas

A temperatura retal (T_r , °C) dos animais foi mensurada utilizando pontas sensoriais (Termoresistência PT-100 classe A) inseridas no reto dos animais e os dados foram distribuídos em três classes com intervalo de 0,1 °C.

2.3.2 Parâmetros Meteorológicos

Os dados de temperatura do ar (T_A , °C) e umidade relativa do ar (UR, %) foram monitorados através de um Psicrômetro Portátil, enquanto os dados de velocidade do ar (U , m s⁻¹) foram obtidos através de um Anemômetro Portátil. Já a temperatura radiante média (TRM) foi estimada utilizando a equação proposta por Silva (2000), a partir dos dados de temperatura do ar, velocidade do vento e da temperatura de um globo negro (esfera oca de chapa de cobre, com 0,15 m de diâmetro e pintada de preto fosco), a qual foi medida com a ponta de prova de um sensor (Termopar tipo K) inserido no centro do globo.

2.3.3 Protocolos Hormonais

A cada grupo de animais foram submetidos a um dos seguintes protocolos de IATF apresentados na tabela 01.

Foram utilizados os seguintes hormônios: dispositivo intravaginal para bovinos impregnado com 1,0g de Progesterona (DIB, Coopers Saúde Animal Ind. e Com. LTDA., São Paulo, Brasil), Gonadotrofina coriônica equina (200 UI/ml de eCG, Novormon®, Schering-Intervet, Brasil), Análogo sintético do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH, 0,042 mg/10 ml Acetato de buserelina, Ourofino Agronegócio, São Paulo, Brasil), Benzoato de Estradiol (BE, 1,0 mg/ml, Syntex Ind. Bioq. & Farmacêutica S.A., Buenos Aires, Argentina) e Cloprostenol Sódico, análogo à $PGF_{2\alpha}$ (Ciosin, 0,530mg/2ml, Intervet do Brasil Veterinária Ltda., São Paulo, Brasil).

Tabela 01 – Tratamentos de IATF realizados no mês de março de 2013.

DIA	P4 + eCG	Pré-Ovsynch + Ovsynch	7CO-synch	Cosynch	P4 + cloproatenol
D -8		0,530 mg de cloprostenol sódico (análogo à PGF2 α), IM		0,530 mg de cloprostenol sódico (análogo à PGF2 α), IM	
D -6		100 μ g GnRH, IM		100 μ g GnRH, IM	
D 0	Inserir P4 (Implante intravaginal) + 2,0 mg BE, IM	100 μ g GnRH, IM	Inserir P4 (implante intravaginal) + 20 μ g GnRH, IM	100 μ g GnRH, IM	Implante P4 + 2,0 mg BE, IM
D 7		0,530 mg de cloprostenol sódico (análogo à PGF2 α), IM	Remoção fonte de P4 +0,530 mg de cloprostenol sódico (análogo à PGF2 α), IM	0,530 mg de cloprostenol sódico (análogo à PGF2 α),IM	
D 8			100 μ g GnRH, IM + Inseminação artificial		
D 9	Remoção fonte de P4 + 200UI eCG, IM	100 μ g GnRH, IM		100 μ g GnRH, IM + Inseminação artificial	Remoção implante + 0,530 mg de D-cloprostenol sódico
D 10	2,0mg BE, IM	Inseminação artificial			
D 11	Inseminação artificial				2,0 mg BE, IM
D 12					Inseminação artificial

2.4. Análise Estatística

Na análise estatística foram realizadas por teste de Tukey a 5 % de significância, por meio do programa Statistic 6.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura retal é um importante indicador do balanço térmico animal que pode ser utilizada para avaliar o impacto do estresse térmico (Oliveira et al., 2005; Darcan et al., 2008. PERISSINOTTO et al. (2009) relatam que uma forma de avaliar as respostas dos animais ao ambiente térmico é por meio da observação de alguns parâmetros fisiológicos, como a temperatura retal (TR) e a frequência respiratória (FR). As variações da TR e da FR podem ser influenciadas, tanto por fatores intrínsecos (idade, raça, estado fisiológico), quanto por fatores extrínsecos (hora do dia, ingestão de alimentos e de água, temperatura ambiente, velocidade do vento, estação do ano).

Durante o experimento as avaliações dos valores médios e mínimos de temperatura retal (TR) indicaram que os animais apresentaram temperatura corporal acima do desejado durante os períodos chuvoso. No entanto, os dados de temperatura (TR) máxima evidencia uma elevação deste parâmetro dos animais. Hansen (2005) relata que cada acréscimo de 0,5°C na temperatura corporal provoca declínio na taxa de concepção de 12,8%, atuando diretamente na lactação seguinte. Baccari (2001) observou que os índices de temperatura retal são influenciados pelo período do dia. O autor relata em seu trabalho que no período da tarde os animais do seu experimento apresentaram temperaturas retais 0,5 a 1,5°C mais elevadas do que pela manhã, e no verão estas temperaturas apresentaram-se mais elevadas quando comparadas àquelas mensuradas no inverno.

Segundo Medeiros et al. (2007), nos animais que são normalmente ativos durante o dia, há uma variação da temperatura retal que é mínima, pela manhã e máxima no período da tarde. Porém, sob estresse térmico, principalmente no período da tarde, a variação da temperatura retal é marcante, evidenciando neste período uma hipertermia. Tal fato faz com que a temperatura do ar à tarde venha a ser a origem da temperatura retal elevada nos trópicos, principalmente nos períodos quentes do ano.

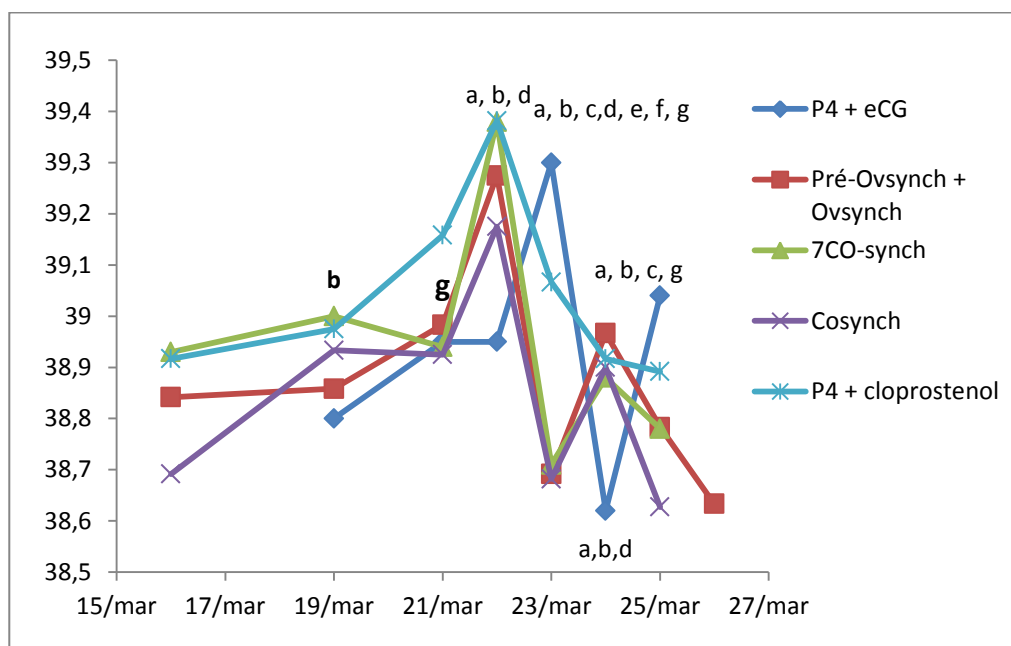
Dhiman & Zaman, (2001) consideraram que a temperatura retal com valor superior a 39,2°C já é um indicativo de estresse por calor, o que pode ser verificado, no valor médio do presente estudo, durante a tarde, no período seco, e em todos os valores de máxima em ambos os turnos e períodos.

Rocha (2008) em um trabalho realizado no município de Pacatuba-CE, objetivando avaliar a existência de estresse térmico em vacas leiteiras mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*), registrou temperaturas máximas do ar mensais, variando de 30,0°C a 34,9°C durante o ano de 2006, o que ocasionou, em determinado momento do dia, a ocorrência de temperatura retal máxima de 43°C nos meses de junho e julho. 24

Ferreira et al. (2006), em avaliação das respostas fisiológicas de bovinos cruzados (1/2 Gir x 1/2 Holandês) submetidos ao estresse térmico, observou no período da tarde, independente da época do ano (verão ou inverno), temperaturas retal 38°C e 38,06°C no período da manhã e à tarde 40,59°C e 41,14°C para as épocas de inverno e verão, respectivamente.

Silva (2008) relatou que, em razão das diferenças na atividade metabólica dos diversos tecidos, a temperatura não é homogênea no corpo todo e varia de acordo com a região anatômica. As regiões superficiais apresentam temperatura mais variável e mais sujeitas às influências do ambiente externo. O mesmo autor afirmou que a temperatura retal é uma boa indicadora da temperatura corporal.

Gráfico 01. Temperatura retal (°C) dos animais expostos aos tratamento de IATF entre os dias 15 a 27 de março de 2013.



Legenda: As letras minúsculas representam significância estatística para $p \leq 0,05$ quando comparados os valores médios de temperatura retal entre os animais de diferentes tratamentos: **a**, P4 + eCG x Pré-Ovsynch + Ovsynch; **b**, P4 + eCG x 7CO-synch; **c**, P4 + eCG x Cosynch; **d**, P4 + eCG x P4 + cloproatenol; **e**, P4 + cloproatenol x Pré-Ovsynch + Ovsynch; **f**, P4 + cloproatenol x Cosynch.

Observa-se que os dados médios de temperatura retal encontram elevados nos protocolos P4+eCG, Pre-Ovsynch+Ovsynch, 7CO-synch e P4+cloprostenol nos dias 21, 22 e 23, onde corresponde a elevados valores médios de umidade relativa (gráfico 1). Verifica-se ainda uma diminuição significativa da temperatura retal a partir do dia 23. Ax C dia 19 – No dia 19 observa-se uma diferença entre os lotes A e C ($p=0,07$) mostrando uma tendência de diferença

No entanto, a umidade relativa máxima (%) para os dias 21 a 23 de março apresentava elevado (acima dos 90%). Já a temperatura do ar máximo estava aproximadamente de 36° C. De acordo com Pereira (2005), todos os valores observados superam os limites da zona de conforto térmico para animais taurinos durante o período, que para esta espécie encontra-se em torno de $0-16^{\circ}$ C. Já para animais mestiços e zebuínos, os valores mínimos de temperatura do ar não superaram os valores limites para estas espécies que está situado entre $5-31^{\circ}$ C e $10-27^{\circ}$ C respectivamente. Contudo, os valores máximos de temperatura encontrados foram superiores aos limites de conforto para estes animais no período do ano (inverno). Estando acima limite crítico para zebuínos que é de 35° C.

Os maiores valores médios de UR (gráfico1) ocorreram a partir do dia 18, com valores máximos e mínimos também mais elevados também neste período, fato explicado pela estação chuvosa neste mês. Rocha (2008) também observou aumento na umidade relativa nos períodos chuvosos entre abril e maio de 2006 na região de Pacatuba no estado do Ceara. Nesta condição ambiental de elevada umidade relativa do ar é prejudicial ao animal no tocante à perda de calor para o ambiente, especificamente nos mecanismos não-evaporativos (condução, convecção e irradiação) que se tornam ineficientes (PEREIRA, 2005; SILVA, 2000).

No gráfico 1 e 2 apresenta os dados de temperatura do ar e umidade relativa do ar para o período experimental, referente ao mês de março de 2012. Observa-se que os valores da temperatura do ar para o período experimental variaram de $21,5^{\circ}\text{C}$ a $38,5^{\circ}\text{C}$, com média de $27,5\pm 2,0^{\circ}\text{C}$. Os valores da umidade relativa do ar para o período experimental variaram de 35,5 % a 90%, com média de $70,00\pm 2,0\%$. Esta condição ambiental de elevada umidade relativa do ar é prejudicial ao animal no tocante à perda de calor para o ambiente (PEREIRA, 2005; SILVA, 2000).

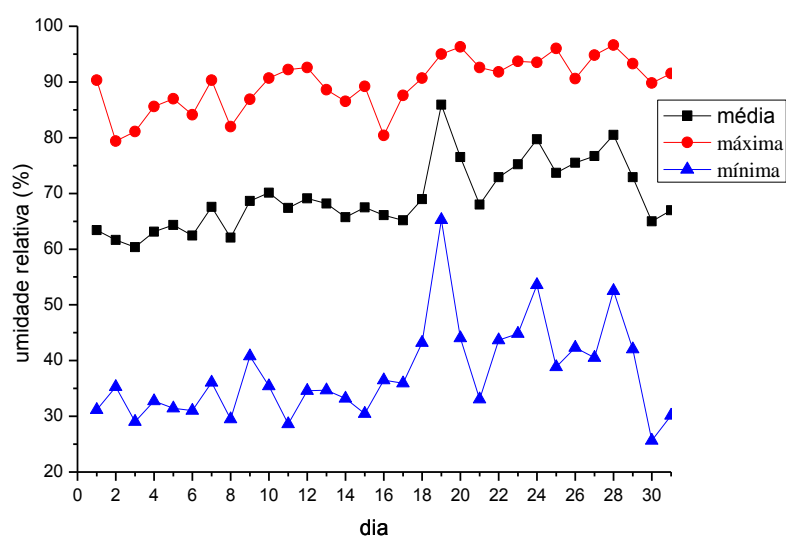


Gráfico 2: Relação da umidade relativa média máxima e mínima e função dos dias em que ocorreram o experimento

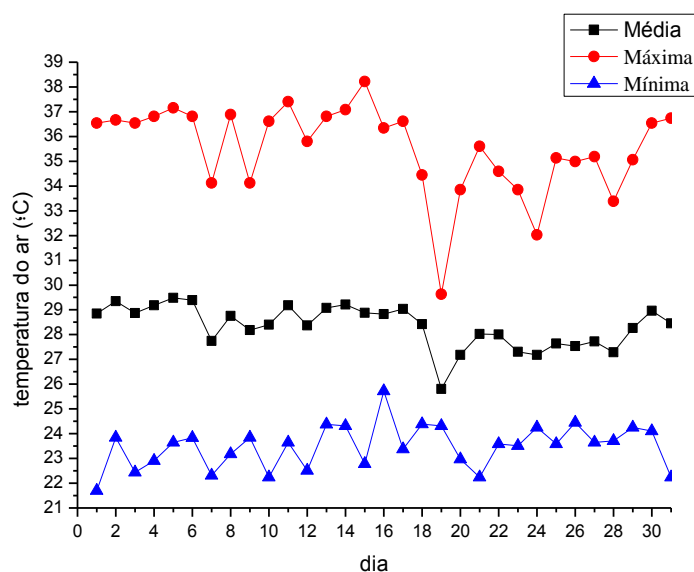


Gráfico 3: Relação da temperatura do ar média, máxima e mínima e função dos dias em que ocorreram o experimento

Foi observado que a carga térmica radiante (CTR) teve maiores valores entre as 10 h e as 16 h com uma média de 550 W m^{-2} (gráfico 3), nas condições de criação da fazenda flor da serra no estado do Ceara, onde o maior valor foi observado as 14 h com 600 Wm^{-2} , indicando estresse térmico nos animais e assemelham-se aos obtidos por MARTINS (2001), que, avaliando a qualidade térmica do sombreamento natural durante o verão, no período entre 12 e 16 h, obteve CTR média de 500 W m^{-2} para a espécie Sapateiro (*Pera glabrata* Baill.). Os valores de CTR para pequenos bosques com sombra de Guajuvira, cuja média foi de 508 Wm^{-2} .

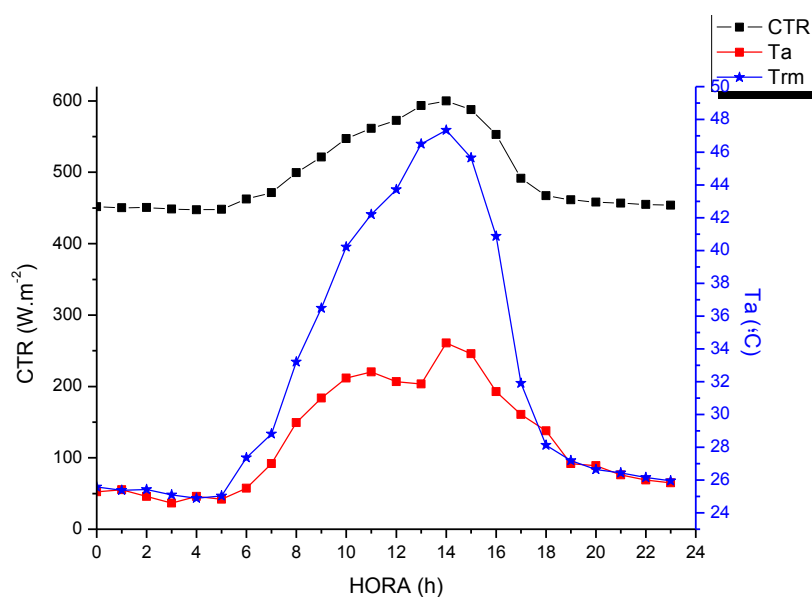


Gráfico 4: Temperatura do ar, temperatura radiante média e CTR média em todas as horas e todos os dias de experimento.

Tabela 2. Grupos de tratamentos, prenhes e proporção(%)

Grupo	Total	Prenhês	Proporção (%)
P4 + eCG	10	2	20 ^a
Pré-Ovsynch	12	3	25 ^a
Ovsynch			
7CO-synch	10	2	20 ^a
Cosynch	12	0	0 ^a
P4 + cloproatenol	12	3	25 ^a

Não foi observada diferença significativa entre os grupos, o que pode ser explicado pela proximidade das proporções, além do número total de animais avaliados por grupo, que permite observar diferenças significativas somente com valores discrepantes.

4. CONCLUSÃO

A mensuração da temperatura retal dos animais evidenciou que os animais mantiveram-se constantemente sob estresse termico, diretamente influenciados pelos fatores ambientais. Este desafio aos animais resultou em baixos resultados em prenhes para todos os protocolos porém, apenas o protocolo Cosynch foi completamente ineficaz para aquela realidade de manejo. Desta forma, este trabalho demonstra o impacto do estresse térmico sobre os protocolos de inseminação na realidade do clima semi árido e abre a perspectiva de novas linhas de pesquisa para se buscar as causas nestas diferenças de resultados entre tratamentos. Este trabalho também salienta a necessidade de inclusão nas técnicas de manejo que visem o conforto termico para os animais.

The first GnRH treatment in a Co-synch protocol is intended to induce ovulation of a dominant follicle (if present) and emergence of a new follicular wave within approximately 2 d [7–9]. Although, in a 12-location study [10] with 2,075 beef heifers subjected to a 7 d Co-synchCIDR protocol, the initial GnRH consistently improved P/TAI across locations, the overall improvement in P/TAI was only 4% in heifers that received the initial GnRH compared to those that did not. Therefore the necessity of the first GnRH treatment in a Co-synchCIDR protocol is questionable. Moreover, accessory CL induced by the initial GnRH may not regress after a single PGF treatment in a 5 d Co-synchPRID protocol, due to the shortened interval from GnRH to PGF administration. To ensure regression of induced CL, two PGF treatments at 12 h intervals are recommended in cows subjected to the modified 5 d Co-synchCIDR protocol [11]. Although, it has been recently reported [12] that a second PGF treatment would not be necessary to cause CL regression in dairy heifers subjected to a 5 d Co-synch CIDR protocol, whether the initial GnRH treatment is necessary to achieve acceptable P/TAI in a 5 d Co-synchPRID protocol has not been investigated.

We hypothesized that TAI after the 5 d Co-synch PRID protocol would result in an increased proportion of pregnant heifers when compared to the 7 d Co-synch PRID protocol, and that the initial GnRH administration in a 5 d Co-synch PRID protocol is not necessary to achieve acceptable P/TAI. Therefore, the objectives were to: 1) compare response to PGF, synchrony of ovulation, and P/TAI in a 5 d versus a 7 d Co-synch PRID protocol (Experiment 1); and 2) investigate whether the initial GnRH is necessary to achieve acceptable P/TAI in a 5 d Co-synchPRID protocol in dairy heifers (Experiment 2).

2. Materials and methods

All procedures were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care [13].

2.1. Animals and diets

This study was conducted with Holstein heifers between 15 and 17 mo of age from a commercial dairy herd located in Wetaskiwin, AB, Canada. Heifers were housed in free-stalls, had unrestricted access to water and were fed a total mixed ration once daily. The diet was designed to meet the nutritional requirements of Holstein heifers weighing 350 kg and gaining 1.0 kg/d [14]. The diet (DM/kg/d) was based on barley

silage

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ambrose DJ, Emmanuel DGV, Colazo MG, Kastelic JP. Pregnancy rates to timed-AI in Holstein heifers given prostaglandin F2 concurrent with, or 24 hours prior to, removal of an intravaginal progesterone-releasing insert. J Dairy Sci 2008;91:2678 – 83

BACCARI Jr., F. Manejo ambiental da vaca leiteira em climas quentes. Londrina, 2001.

BACCARI JR., F. Métodos e técnicas de avaliação da adaptabilidade dos animais às condições tropicais. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BIOCLIMATOLOGIA ANIMAL NOS TRÓPICOS: PEQUENOS E GRANDES RUMINANTES, 1986, 1., Fortaleza. Anais... Brasília: EMBRAPA-DIE, 1990. p.9-17. (EMBRAPA-CNPC. Documentos, 7).

BARBOSA, O. R.; DAMASCENO, J. C. Bioclimatologia e bem estar animal aplicados à bovinocultura de leite. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Jun 2002.

BILBY, T. R.; TATCHER, W.W.; HANSEN, P.J. Estratégias farmacológicas, nutricionais e de manejo para aumentar a fertilidade de vacas leiteiras sob estresse térmico. In: XIII CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2009, Uberlândia, MG. **Anais...** 2009, p. 59-71.

BURATINI JR., J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A. et al. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v.54, p.421-431, 2000

Corassin, H.C. Determinação e avaliação de fatores que afetam a produtividade de vacas leiteiras: aspectos sanitários e reprodutivos. 2004. 113f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2004.

DARCAN, N.; GÜNEY, O. Alleviation of climatic stress of dairy goats in Mediterranean climate. *Small Ruminant Research*, v.74, 212-215, 2008.

DAMASCENO, J. C.; BACCARI JR, F.; TARGA, L. A. Respostas comportamentais de vacas holandesas, com acesso à sombra constante ou limitada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 4, Brasília; Abr 1999.

DHIMAN, T.R.; ZAMAN, M.S. Desafios dos sistemas de produção de leite em confinamento em condições de clima quente. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO DE GADO DE LEITE, 2., 2001, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. p.05-20.

FERREIRA, F.; PIRES, F.A.; MARTINEZ, M.L.; et al. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.5, p.732-738, 2006.

Gonçalves PBD, Oliveira MAL, Mezzalira A, Montagner MM, Visitin JA, Costa LFS. Produção in vitro de embriões. In: *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.261-291.

Guzeloglu, A.; Ambrose, D.J.; Kassa, T.; Diaz, T.; Thatcher, J.M.; Tatcher, J.J. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. *Anim Reprod Sci*, v.66, p.15-34, 2001.

HAFES, E.S.E. *Reprodução animal*. 7ª edição: Editora Manole. São Paulo, 2004, p.381-398.

HANSEN, J.P. Managing the Heat-Stressed Cow to Improve Reproduction. *Proceedings of the 7 th Western Dairy Management Conference*. March 9-11, 2005.

HANSEN, P. J. Manejo da vaca de leite durante o estresse calórico para aumento da eficiência reprodutiva. In: XI CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2007. Uberlândia, MG **Anais...** 2007, p. 3-12.

KASTELIC JP, KNOFF L, GINTER OJ 1990: Effect of day of prostaglandin F2 α treatment on selection and development of the follicle in heifers. *Anim Reprod Sci* 23: 169-180

Kornmatitsuk, B.; Chantaraprateep, B.; Kommatitsuk, S.; Kindahl, H. Different types of postpartum luteal activity affected by the exposure of heat stress and subsequent reproductive performance in Holstein lactating cows. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.515-519, 2008.

Kasimanickam R, Day ML, Rudolph JS, Hall JB, Whittier WD. Two doses of prostaglandin improve pregnancy rates to timed-AI in a 5-d progesterone-based synchronization protocol in beef cows. *Theriogenology* 2009;71:762–7.

LAMB, G.C. Avaliação de protocolos de sincronização que utilizam implantes de progesterona. In: VII Curso Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos. Anais... Uberlândia-MG, p. 199-211, 2003.

Lamb GC, Larson JE, Geary TW, Stevenson JS, Johnson SK, Day ML, Ansoategui RP, Kesler DJ, DeJarnette JM, Landblom DG. Synchronization of estrus and artificial insemination in replacement beef heifers using gonadotropin-releasing hormone, prostaglandin F2, and progesterone. *J Anim Sci* 2006; 84:3000 –9.

LUCY, M.,C. Estratégias de manejo de vacas leiteiras para melhoria dos índices reprodutivos durante o verão. Anais do V curso "Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos, p.12-18, 2001.

Inskeep, E. K. 1973. Potential uses of prostaglandins in control of reproductive cycles of domestic animals. *J. Anim. Sei.* 36:1149.

Macmillan KL and Thatcher WW. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod* 1991;45:883–9.

MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.; MAPLETOFT, R.J. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *Theriogenology*, v.54, p.757-769, 2000.

MARTINS, J.L. *Avaliação da qualidade térmica do sombreamento natural de algumas espécies arbóreas, em condições de pastagem*. 2001. 99 f. Dissertação (Mestrado em Água e Solo) -Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

MAPLETOFT, R.J. et al. Advances in the manipulation of donor and recipient estrous cycle in bovine embryo transfer programs. *Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS*, Porto Alegre, v.28, n.1, p.23-48, 2000.

MARQUES, J. A. **I Curso de atualização por tutoria à distância atualização da produção de bovinos de corte**, p. 486 – 527, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2001.

MARTELLO, L. S.; SAVASTANO JR, H.; PINHEIRO, M. G. Avaliação do microclima de instalações para gado de leite com diferentes recursos de climatização. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 263-273, maio/ago. 2004.

MARTELLO, L. S. **Interação animal-ambiente: efeito do ambiente climático sobre as respostas fisiológicas e produtivas de vacas Holandesas em free-stall**, 2006. Tese (Doutorado em Qualidade e Produtividade Animal)- Universidade de São Paulo. Pirassununga – SP.

MEDEIROS, L.F.D.; VIEIRA, D.H.; OLIVEIRA, C.A.; et al. Avaliação de parâmetros fisiológicos de caprinos SPRD (sem padrão racial definido) pretos e brancos de diferentes idades, à sombra, no município do Rio de Janeiro, RJ. **Revista Brasileira da Indústria Animal**, v.64, n.4, p.277-287, 2007.

Martínez MF, Adams GP, Bergfelt DR, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci* 1999;57:23–33.

PEGORER, M. F. **Influência do estresse calórico na reprodução de vacas leiteiras de alta produção**. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2006.

PEREIRA, C.C.J. Fundamentos de Bioclimatologia Aplicados à Produção Animal. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2005

PERISSINOTTO, M.; MOURA, D.J.; CRUZ, V.F.; et al. Conforto térmico de bovinos leiteiros confinados em clima subtropical e mediterrâneo pela análise de parâmetros fisiológicos utilizando a teoria dos conjuntos fuzzy. **Revista Ciência Rural**, v.39, n.5, p.1492-1498, 2009.

PFEIFER, L.F.M.; CORRÊA, M.N.; SCHMMIT, E.; VIEIRA, M.B.; MADRUGA, E.Á.; RABASSA, V.R. Uso de PGF_{2a} associado ao benzoato de estradiol para Inseminação artificial em tempo-fixo em vacas leiteiras. *Rev. Bras. Agroc.*, v. 11, n. 3, p. 347-350, 2005.

PIRES, M. F. A. **Manejo nutricional para evitar o estresse calórico**, EMBRAPA, Juiz de Fora, MG, p. 1-4, Nov 2006. (Comunicado técnico, 52).

PUTNEY, D.J., DROST, M., THATCHER, W.W. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology*, v.31, p.765-778, 1989a.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2a} and GnRH. **Theriogenology**, Woburn, v. 44, n. 7, p. 915-923, Nov. 1995.

Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson, Ottobre JS, GarverickHA, Anderson LL. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci* 1997;80:295–300.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. Usando a energia: enfrentando desafios ambientais. In:_____. **Fisiologia Animal**. 4. Ed. p. 619-674. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2000.

Rensis, F,D; Scaramuzzi, J,R. Heat Stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. *Theriogenology*, v.6, p.1139-1151, 2003.

RIVERA, R.M., HANSEN, P.J. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. **Journal. Reproduction and Fertility**, v. 121, p. 107-115, 2001.

ROBINSON, N. E. Homeostase – Termorregulação. In: CUNNINGHAM, J. G. Tratado de Fisiologia Veterinária. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 579. p. 550.

ROCHA, D.R. Avaliação de estresse térmico em vacas leiteiras mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) criadas em clima tropical quente e úmido no estado do Ceará. 2008. 67f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Santos, J.E.P.; Thatcher W.W.; Chebel, R.C.; Cerri, R.L.A.; Galvão, K.N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p.513-535, 2004.

Schmitt EJP, Diaz T, Drost M, Thatcher WW. Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *J Anim Sci* 1996;74:1084 –91.

SILVA, R.G. **Biofísica ambiental. Os animais e seu ambiente**. 1.ed. Jaboticabal: Funep, 2008, 393p.

Thatcher, W.W; Moreira, F; Santos, J.E.P; Mattos, R.C; Lopes, F.L; Pancarci, S,M; Risco, C,A; Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, v.55, p.75-89. 2001

THATCHER, W. W. Manejo de estresse calórico e estratégias para melhorar o desempenho lactacional e reprodutivos em vacas de leite. XIV CURSO NOVOS

ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2010. Uberlândia, MG. **Anais...** 2010, p. 2-25.

[8] Twagiramungu H, Guibault LA, Dufour JJ. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. *J Anim Sci* 1995;73:3141–51

WOLFENSON, D.; THATCHER, W. W.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; LUCY, M. C. The effect of a GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronization of estrus in lactating cyclic dairy cows. **Theriogenology**, Woburn, v. 42, n. 4, p. 633-644, Sept. 1994.

ANEXO I

- **THERIOGENOLOGY - GUIDE FOR AUTHORS**

(<http://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>)

INTRODUCTION

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to Theriogenology. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. Theriogenology publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of article

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Technical Notes

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

Technical Notes are concise, comprehensive descriptions of technical aspects of innovative methods (that will not be subsequently published as a full-length paper). The entire submitted manuscript typically should not exceed approximately 12 double-spaced pages.

Page Charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>

Policy and Ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of Theriogenology.

Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>

Submission Declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under current consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that

all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition, analysis and interpretation of data; (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to Authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript, together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles (including abstracts) for internal circulation within their institutions. However, permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>).

Retained Author Rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details see <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the Funding Source

You are requested to identify the source(s) of financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in writing the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement, this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Open Access

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

2. Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY NC SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Creative Commons Attribution (CC-BY): available only for authors funded by organizations with which we have established an agreement with. For a full list please see www.elsevier.com/fundingbodies

Elsevier has established agreements with funding bodies. This ensures authors can comply with funding body Open Access requirements, including specific user licenses, such as CC-BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. www.elsevier.com/fundingbodies

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The Open Access publication fee for this journal is \$USD 2,500, excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy

www.elsevier.com/openaccesspricing

Funding Body Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors, whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies, please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online; you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail, removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/therio>.

Referees

Please submit, as part of the covering letter with the manuscript, the names, full affiliations (department, institution, city and country) and e-mail addresses of 3 potential Referees. Appropriate Referees should be knowledgeable about the subject, but have no close connection with any of the authors. You may also suggest reviewers you do not want to review your manuscript, but please state your reasons for doing so.

PREPARATION**Use of word-processing software**

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format and double spaced. It is important that all pages and lines are numbered. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts, etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the word processor's facility. When preparing

tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. In lieu of a grid, use tabs, not spaces, to align columns. Electronic text should be prepared similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file; instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your word processor, and to read it critically.

Article Structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1. (then 1.1.1., 1.1.2., ...), 1.2., etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line, with one blank line above and below.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Introduction should generally not exceed 2 manuscript pages (double-spaced).

Materials and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published in a readily available source should be indicated by a reference (only relevant modifications should be described).

Results

Results should be clear and concise. If data are reported in a table or figure, the text should only highlight the information, but not repeat it in detail.

Discussion

This should explore the relevance and implications of the results of the work, not simply repeat them. A combined Results and Discussion section may be appropriate. Avoid excessive citations and discussion of published literature. Although there are always exceptions, in general the Discussion section

should generally not exceed 40% of the manuscript (excluding references, figures, and tables) and there should be no more than 35 references (except for review papers).

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or a Results and Discussion section.

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations, trade names, and formulae.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. First names or initials can be used according to author preference. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of review and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-

standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Some keywords may be identical to words used in the title, but consideration should be given to keywords which are complimentary to words used in the title (to facilitate retrieval of your article from electronic databases). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field should be used. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). Please see Additional Style Notes below.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build

footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Image manipulation

Although it is generally accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. Avoid excessively large fonts.
- For labels on figures, both those on the figure axes as well as those directly on the figure, capitalize only the first letter of the first word.
- Do not prepare a figure to communicate very limited data that could easily be included in the text of the Results.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:
<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g.,
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites), regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **Information regarding the cost of color reproduction in print will be sent by Elsevier after your article has been accepted.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Since technical complications can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version, should you not opt for color in

print), if you have any figures with color that will not be published in color in the printed version, please submit two versions (color and usable black and white).

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Present incidental graphics not suitable for mention as figures, plates or schemes at the end of the article and number them "Graphic 1", etc. Their precise position in the text can then be indicated. See further information under Electronic artwork. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left, but such embedding should not be done specifically for publishing purposes. Further, high-resolution graphics files must be provided separately.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given

in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: "...as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result..."

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they first appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51-9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors, the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details, you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomed-

cal Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927-34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Do not abbreviate a journal name which is a single word, or is in a language other than English.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer authors additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips, etc. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. To ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Additional style notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 &Mg;g im]").

- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)

- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."

The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

AI	ANOVA	ADP	ATP	BSA
cAMP	CL	DEAE-cellulose	DMSO	DNA
eCG	EDTA	EGF	ELISA	FSH
GH	GnRH	hCG	HEPE	ShMG
IVC	IVF	IVM	LH	MOET
MSH	mRNA	NAD	NADH	PBS
PGF _{2α}	PGFM	PIPES	PRID	PRL
RIA	RNA	SDS-PAGE	SCNT	TRH
TRIS	tRNA	TSH		

Units of Measure

cpm - counts per min

dpm - disintegrations per min

g - gram

ga - gauge of hypodermic needle

h – hour

kg – kilogram

L – liter

mL - milliliter

&mgr;L - microliter

m – meter

min – minute

mo - month

s - second

v:v - volume ratio

wk - week

wt/vol - weight per volume

y - year

Routes of treatment

id – intradermal

im – intramuscular

iu – intrauterine

iv – intravenous

sc – subcutaneous

po - oral

Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance

CV - coefficient of variation

df - degrees of freedom

F - variance ratio

NS - not significant

P – probability

SD - standard deviation

SEM - standard error of the mean

r - correlation coefficient

r² - coefficient of regression

Additional information

- For issues of style and format not addressed here, please consult *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, Sixth Edition.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the CBE Manual or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.

- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.

Submission Checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details regarding any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked' (and critically read and reviewed)
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information.

The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal Physics Letters B):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address, then paper proofs will be sent by post), or a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are on the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and send by e-mail or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaran-

teed. Proofreading is solely your responsibility. Note that if no response is received, Elsevier may proceed with publication of your article.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

Updated January 2012

ANEXO II