

Progesterona antes da IA (efeito no ovócito) e apos a IA (desenvolvimento do embrião) no sucesso de prenhez

S. G. Kruse¹, F. Abreu², L.H. Cruppe², M. L. Day², H. P. Dias³, and G. A. Bridges¹

¹University of Minnesota

²The Ohio State University

³ UNESP - BOTUCATU

Introdução

A falha da prenhez pode ser causada por diversos fatores, embora a causa mais comum seja a perda embrionária durante a fase inicial da gestação. Dois fatores primordiais que influenciam a probabilidade de perda embrionária são a qualidade do ovócito ovulado e o suporte uterino ao desenvolvimento embrionário. A ovulação de um ovócito de baixa qualidade geralmente leva à mortalidade embrionária precoce (antes do alongamento do conceito), embora a fertilização do ovócito geralmente não seja inibida. Da mesma forma, a disfunção uterina no início da gestação pode levar à morte embrionária. Em ambos os casos, a qualidade do ovócito e a função uterina podem ser reguladas pelas concentrações circulantes de progesterona antes e depois da ovulação, respectivamente. As concentrações pré-ovulatórias de progesterona podem influenciar a liberação do hormônio luteinizante (LH), que afeta a maturação do ovócito, o crescimento folicular e a produção de estradiol (Rahe et al., 1980; Schallenberger et al., 1985; Savio et al., 1993; Gong et al., 1995). A alteração do amadurecimento do ovócito ou a presença de quantidades pré-ovulatórias limitadas de estradiol podem causar queda da fertilidade. Além disso, a sensibilidade às concentrações de progesterona durante o desenvolvimento folicular pode variar entre raças bovinas (*Bos indicus* e *Bos taurus*; gado de corte e de leite). Após a ovulação, as concentrações de progesterona presentes no início da gestação podem influenciar a função uterina e a taxa de crescimento embrionário (Garrett et al., 1988; Satterfield et al., 2006). Diversos estudos demonstraram que as concentrações de progesterona e o grau de elevação dos níveis de progesterona após a ovulação afetam o sucesso da prenhez (Johnson, 1958; Mauer e Echternkamp, 1982; Robinson et al., 1989; Starbuck et al., 2004). Portanto, o objetivo deste artigo é descrever os possíveis mecanismos através dos quais as concentrações pré e pós-ovulatórias de progesterona influenciam o sucesso da prenhez em bovinos.

Importância da Progesterona Antes da Inseminação

As concentrações circulantes de progesterona durante o ciclo estral regulam a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo (Rahe et al., 1986; Schallenberger et al., 1985; Kinder et al., 1996) e a secreção de gonatrofinas (LH e hormônio folículo estimulante, ou FSH) pela hipófise anterior (Savio et al., 1993; Gong et al., 1995). A liberação de gonadotrofinas pela hipófise anterior regula o desenvolvimento folicular e influencia a maturação do ovócito, além de ser fundamental para a produção de hormônios esteroides. O hormônio folículo estimulante (FSH) é necessário para iniciar a onda folicular (Ginther, 2000), enquanto o hormônio luteinizante (LH) regula o estágio final do crescimento folicular (Savio et al., 1993) e a maturação do ovócito (Gong et al., 1995). Além disso, o LH promove a produção e a secreção de estradiol pelo folículo dominante (Schallenberger et al., 1984). Altas concentrações de progesterona resultam em redução da pulsatilidade do LH, embora

com aumento da amplitude dos pulsos. Em contrapartida, na presença de baixas concentrações de progesterona, como após a luteólise, a frequência de pulsos de LH aumenta (Rahe et al., 1980). Após a luteólise, quando as concentrações de progesterona são baixas, a maior pulsatilidade de LH estimula o crescimento do folículo dominante (Taft et al., 1996), o aumento da produção de estradiol e a ocorrência de estro e ovulação. Em contraste, durante os períodos de altas concentrações de progesterona, a baixa frequência de pulsos de LH deixa de sustentar o crescimento folicular, resultando em atresia do folículo dominante (Adams et al., 1992). Diversos pesquisadores se basearam neste princípio para alterar a frequência de liberação de LH através da administração de progesterona exógena. A progesterona tem efeito dose-dependente sobre a secreção de LH (Kinder et al., 1996). Kojima e colaboradores (1992) demonstraram que a administração e doses subluteais de progesterona exógena na ausência de corpo lúteo (CL) resulta em um padrão de secreção de LH semelhante ao que se verifica na fase folicular em bovinos. A alteração da regulação da liberação de LH pela progesterona pode afetar o desenvolvimento e a capacidade futura do ovócito de ser fertilizado e resultar em prenhez. Quando o período de exposição a concentrações subluteais de progesterona é muito prolongado, folículos persistentes se desenvolvem, com drástica redução da fertilidade (Kinder et al., 1996). Entretanto, a influência de períodos limitados de baixas concentrações de progesterona sobre a secreção de LH, o crescimento folicular, a competência do ovócito e a fertilidade ainda não foi determinada.

Concentrações de progesterona durante o desenvolvimento folicular e sucesso da prenhez

Com a exceção de estudos que investigaram a relação entre a ocorrência de folículos persistentes e a infertilidade, poucos estudos avaliaram diretamente os efeitos das concentrações de progesterona e das concentrações subsequentes de LH durante o desenvolvimento da onda folicular sobre a qualidade do ovócito cuja ovulação foi induzida e o sucesso da prenhez. Estudos adicionais que investigaram as concentrações de progesterona durante protocolos de sincronização de estro indicam que as concentrações de progesterona presentes durante o desenvolvimento da onda folicular ovulatória podem afetar a fertilidade. Entretanto, as concentrações ideais de progesterona necessárias para estimular a fertilidade parecem variar entre as espécies *Bos indicus* e *Bos taurus*, assim como entre bovinos de leite e corte.

Nos últimos anos, diversos estudos realizados em bovinos Nelore demonstraram que a redução das concentrações de progesterona durante os estágios finais do crescimento folicular melhora as taxas de prenhez, embora isso não tenha sido determinado em animais *Bos taurus*. A diferença entre as espécies bovinas pode ser explicada pelo estudo realizado por Carvalho et al. (2008), comparando o intervalo desde a implantação do CIDR e a administração de estradiol até a emergência da onda folicular em novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos Taurus* e *Bos taurus*. Embora o intervalo entre a administração de estradiol e a emergência da onda folicular não tenha diferido entre os grupos (3,2 dias), as novilhas *Bos indicus* puras apresentaram os menores folículos dominantes ao final do tratamento com CIDR. Concentrações mais altas de progesterona circulante durante a sincronização do estro também foram associadas à redução da velocidade de crescimento do folículo dominante nas novilhas *Bos indicus*, indicando que animais *Bos indicus* são mais sensíveis aos efeitos da progesterona e que altas concentrações pré-ovulatórias de progesterona podem prejudicar o desenvolvimento folicular nesses animais.

A fim de aumentar as taxas de prenhez à IATF em bovinos *Bos indicus*, diversas abordagens voltadas para a redução das concentrações de progesterona durante o desenvolvimento folicular

e/ou o aumento das concentrações de gonadotrofinas durante os protocolos de sincronização da ovulação foram investigadas (Claro et al., 2010; Meneghetti et al., 2009; Sá Filho et al., 2009; Peres et al., 2009; Dias et al., 2009). Uma forma de aumentar o suporte gonadotrófico ao folículo dominante é o prolongamento da duração do proestro, ou seja, o aumento do intervalo entre a regressão do corpo lúteo e a onda de LH. Foi demonstrado que as taxas de prenhez são mais altas em animais com proestro mais longo, tanto em bovinos *Bos indicus* como em bovinos *Bos taurus* (Vasconcelos et al., 2001; Mussard et al., 2007; Bridges et al., 2008; Perez et al., 2009). Outra abordagem empregada para reduzir as concentrações de progesterona durante o desenvolvimento folicular é a administração de uma dose luteolítica de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF) antes da remoção do CIDR, o que melhora a fertilidade em fêmeas *Bos indicus* (Peres et al., 2009). Além disso, a gonadotrofina coriônica equina (eCG) aumenta as taxas de prenhez à IATF quando administrada no final do tratamento com CIDR em vacas em anestro. A administração de eCG tem o potencial de aumentar as taxas de prenhez por permitir a ovulação de um folículo dominante maior, que resulta em um CL maior e em concentrações circulantes de progesterona mais altas 12 dias após a ovulação (Vasconcelos et al., 2001; Baruselli et al., 2003; Peres et al., 2009; Sá Filho et al., 2009). Não se sabe se a administração de eCG afeta diretamente a competência do ovócito. Entretanto, após a aspiração de um mesmo número de folículos em ambos os grupos, vacas tratadas com eCG geraram mais que o dobro de ovócitos viáveis em relação a vacas que não receberam estimulação com eCG antes da aspiração folicular (Aller et al., 2012).

Outra estratégia de manejo usada para aumentar o suporte gonadotrófico ao folículo ovulatório em protocolos de sincronização da ovulação é o emprego de CIDRs usados. Uma vez que animais *Bos indicus* são mais sensíveis às concentrações circulantes de progesterona, o emprego de um CIDR com concentrações mais baixas de progesterona pode diminuir a queda da secreção de LH induzida pela progesterona, melhorando o crescimento folicular, a produção de estradiol, a qualidade do ovócito e a fertilidade. Em um estudo realizado por Claro et al. (2010), as taxas de prenhez em novilhas Nelore pré-púberes foram maiores após a sincronização com CIDRs usados (resultando em níveis séricos de progesterona da ordem de $2,0 \pm 0,11$ ng/mL e taxa de prenhez de 47,7%) do que com CIDRs novos (progesterona sérica = $2,31 \pm 0,11$ e taxa de prenhez de 39,2%). Em outro estudo envolvendo novilhas Nelore púberes, o emprego de CIDRs usados para reduzir as concentrações de progesterona resultou em maior diâmetro do folículo ovulatório e em taxas mais elevadas de prenhez à IATF (Dias et al., 2009). Em conjunto, tais estudos demonstram que animais *Bos indicus* apresentam taxas de prenhez mais altas quando expostos a um ambiente mais pobre em progesterona antes da ovulação. Embora o mecanismo exato por trás da melhora da fertilidade em ambientes mais pobres em progesterona não tenha sido esclarecido, diversos fatores podem estar envolvidos. As baixas concentrações de progesterona podem aumentar a secreção de LH, estimulando o crescimento folicular e a produção de estradiol, fatores esses que influenciam as taxas de prenhez em bovinos (Vasconcelos et al., 2001; Perry et al., 2005; Bridges et al., 2010). Além disso, a ovulação de folículos maiores geralmente resulta no desenvolvimento de um CL maior, capaz de produzir mais progesterona. Conforme será discutido mais adiante, as concentrações pós-ovulatórias de progesterona são fundamentais para a sobrevivência do embrião e o aumento dos níveis de LH pode promover a ovulação de um ovócito de melhor qualidade.

Nas raças bovinas *Bos taurus*, as implicações de baixas concentrações de progesterona durante o desenvolvimento folicular não foram esclarecidas e há menos estudos investigando tais interações. Entretanto, em um estudo recente envolvendo novilhas de corte mestiças, a redução

das concentrações circulantes de progesterona durante o desenvolvimento da onda folicular resultou em um folículo maior no momento da remoção do CIDR possivelmente devido ao aumento da secreção de LH em resposta à queda da progesterona circulante (Sparks et al., 2012). Sparks e colaboradores (2012) também observaram concentrações de progesterona mais altas no ciclo estral subsequente nas novilhas do grupo de tratamento de baixa progesterona, provavelmente devido à ovulação de um folículo maior. Entretanto, não houve aumento das taxas de prenhez à IA após a sincronização do estro com o protocolo baseado em baixas concentrações de progesterona durante o desenvolvimento da onda folicular, sugerindo que as concentrações pré-ovulatórias de progesterona podem não ter o mesmo impacto nas raças *Bos taurus* e *Bos indicus*. Entretanto, novas pesquisas se fazem necessárias para esclarecer definitivamente a questão.

Em vacas leiteiras lactantes, há evidências de que concentrações mais altas de progesterona durante o desenvolvimento folicular sejam necessárias para a maximização da fertilidade (Cerri et al., 2009, 2011; Denicol et al., 2012). Recentemente, foi demonstrado que o emprego de dois CIDRs resulta em concentrações mais altas de progesterona circulante antes da ovulação e em maiores taxas de prenhez em vacas leiteiras em lactação (Denicol et al., 2012). Tais pesquisadores concluíram que os protocolos de sincronização de estro em vacas leiteiras lactantes devem garantir concentrações de progesterona acima de 2 ng/mL durante o desenvolvimento folicular para que haja maior probabilidade de prenhez à IA. Além disso, a implementação do protocolo de sincronização do estro durante a segunda onda folicular, quando as concentrações de progesterona são mais altas, melhora as taxas de prenhez à IATF em vacas leiteiras em lactação (Bisinotto et al., 2010). Embora não se saiba o motivo da melhora da fertilidade em vacas leiteiras em lactação na vigência de concentrações mais altas de progesterona durante a sincronização do estro, a regulação da liberação de LH pela progesterona pode estar envolvida. As concentrações de progesterona são bem mais baixas em vacas leiteiras lactantes do que em vacas leiteiras secas e novilhas leiteiras devido à maior ingestão alimentar, ao maior fluxo sanguíneo hepático e ao maior catabolismo esteroide (Sangsritavong et al., 2002; Sartori et al., 2004). É possível que as baixas concentrações de progesterona durante a sincronização do estro levem à secreção anormal de LH, afetando a qualidade do ovócito cuja ovulação foi induzida. Tudo isso é especulativo e novas pesquisas são necessárias para esclarecer o motivo da queda das taxas de prenhez em vacas leiteiras em lactação quando a sincronização do estro é realizada com baixas concentrações de progesterona.

Efeito das concentrações de progesterona durante o desenvolvimento folicular sobre a competência do ovócito

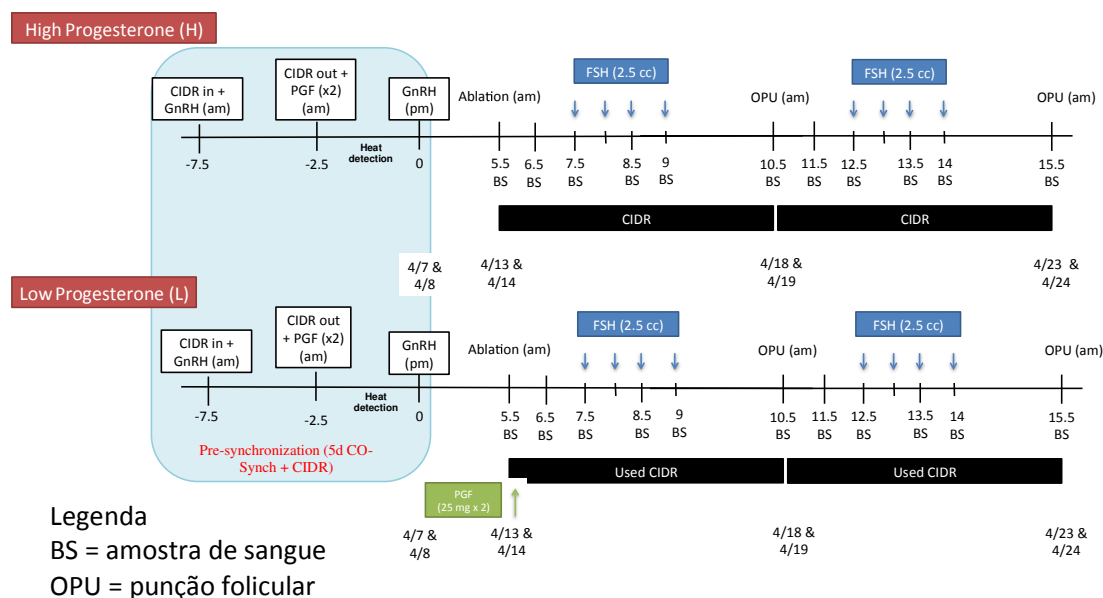
Recentemente, nosso laboratório começou a pesquisar a influência das concentrações de progesterona durante o desenvolvimento folicular sobre a competência do ovócito. A redução das concentrações circulantes de progesterona durante a onda folicular pode proporcionar maior suporte gonadotrófico ao folículo ovulatório (Robinson et al., 1989; Dias et al., 2009) e maior produção folicular de estradiol (Sirois e Fortune, 1990), além de afetar diretamente a maturação e a competência do ovócito (Driancourt et al., 1998; van de Leemput et al., 1998). Conforme demonstrado previamente, ovócitos bovinos obtidos a partir de folículos pré-ovulatórios com concentrações mais altas de estradiol têm maior probabilidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto *in vitro* (van de Leemput et al., 1998). Além disso, a inibição dos pulsos de LH e o declínio subsequente da produção folicular de estradiol reduzem a proporção de ovócitos ovinos

que sofre clivagem e atinge o estágio de blastocisto (Oussaid et al., 1999). Dado o papel do LH na maturação do ovócito (Savio et al., 1993; Gong et al., 1995) e a sua capacidade de inibir a produção de estradiol pelo folículo dominante (Schallenberger et al., 1984), o aumento da pulsatilidade de LH através da redução das concentrações de progesterona pode favorecer a competência do ovócito. Isso motivou a realização de dois experimentos em nosso laboratório, ambos envolvendo novilhas de corte *Bos taurus* e voltados para a determinação da influência das concentrações circulantes de progesterona sobre a dinâmica folicular e a competência do ovócito. A punção folicular (OPU) transvaginal guiada por ultrassom foi empregada para coletar ovócitos de fêmeas com diferentes concentrações de progesterona. Em seguida, os ovócitos foram avaliados quanto à qualidade e capacidade de se diferenciar em blastocisto após a produção de embriões *in vitro* (PIV). Hipotetizamos que a redução das concentrações de progesterona durante o crescimento folicular resultaria em aumento da concentração de LH, promovendo o desenvolvimento de um ovócito mais competente, com maior probabilidade de diferenciação em blastocisto.

O primeiro experimento foi realizado com novilhas de sobreano da raça Charolês (n = 36). Todas as novilhas foram pré-sincronizadas para apresentar estro no mesmo dia do ciclo estral (estro = dia 0; Figura 1) e alocadas para um dos seguintes tratamentos: 1) progesterona alta (H) ou 2) progesterona baixa (L). A ablação folicular foi realizada no dia 5,5 para reiniciar e padronizar o crescimento folicular. Imediatamente após a punção, as novilhas do grupo de tratamento L receberam um CIDR usado e duas injeções de 25 mg de PGF, com um intervalo de 6 a 8 horas, para a indução da luteólise. Consequentemente, a única progesterona presente na circulação no grupo de tratamento L era proveniente do CIDR usado. No momento da ablação folicular, as novilhas do grupo de tratamento H receberam um CIDR novo e não receberam PGF. O crescimento folicular foi estimulado através da administração de 40 mg de FSH nos dias 7,5, 8, 8,5 e 9 e os ovócitos foram coletados por OPU de todos os folículos visíveis no dia 10,5. Após a OPU inicial, as novilhas receberam outro CIDR novo (grupo de tratamento H) ou usado (grupo de tratamento L) e receberam nova injeção de 40 mg de FSH nos dias 12,5, 13, 13,5 e 14 para estimular o crescimento folicular. Uma segunda OPU foi realizada no dia 15,5 para a coleta de ovócitos de todos os folículos visíveis. As concentrações circulantes de progesterona foram avaliadas durante todo o ensaio e, no momento da OPU, o número de folículos aspirados foi registrado. Os ovócitos coletados foram imediatamente transportados para o laboratório e classificados (conforme descrição de Blondin et al., 1996; Tabela 1). Após a classificação, os ovócitos foram agrupados por tratamento e colocados no meio de maturação. Infelizmente, devido a imprevistos ocorridos no laboratório, a PIV de embriões não foi suficiente para possibilitar conclusões a respeito do efeito do tratamento sobre a viabilidade do ovócito *in vitro*. Por esse motivo, apenas o número de folículos, a coleta de ovócitos e os parâmetros de qualidade do ovócito puderam ser avaliados no estudo.

Tabela 1. Classificação dos complexos cúmulo-ovócito bovinos (CCO)^{a,b}

Categoria do Ovócito	Nº de camadas do cúmulo	Expansão do cúmulo	Textura do ooplasma
1	≥ 5	Compacto	Homogêneo
2	≥ 5	Compacto	Zona escura na periferia
3	≥ 5	Discreta expansão nas camadas externas	Granulações discretas
4	≥ 5	Expansão completa com grumos escuros	Granulações grosseiras
5	1	Somente corona radiata	Variável
6	0	Ausência de cúmulo	Variável

^aAdaptado de Blondin et al., 1996.^bOvócitos que não se enquadraram na classificação empregada foram omitidos.**Figura 1.** Delineamento do Experimento 1

Conforme esperado, durante o crescimento folicular as concentrações de progesterona diferiram ($P < 0,01$; Figura 2) entre os tratamentos a cada coleta realizada após a ablação. As novilhas do grupo de tratamento L produziram número maior de folículos ($P = 0,03$; Tabela 3) e apresentaram maior número de ovócitos recuperados ($P = 0,02$; Tabela 2) do que as novilhas do grupo de tratamento H. Além disso, o número de ovócitos de grau 1 a 3 por animal ($P = 0,02$; Tabela 3) foi maior nas novilhas do grupo de tratamento L do que nas novilhas do grupo de tratamento H.

Tabela 2. Efeitos da concentração de progesterona sobre o número de folículos aspirados, o número de ovócitos recuperados e o número de ovócitos de grau 1 a 3 coletados por novilha no Experimento 1¹

Progesterona	Alta (n = 31)	Baixa (n = 37)
Folículos Aspirados	12,1 ± 1,0 ^a	15,3 ± 1,1 ^b
Ovócitos Recuperados	6,4 ± 0,8 ^a	9,9 ± 1,2 ^b
Ovócitos de grau 1 a 3	4,8 ± 0,7 ^a	7,8 ± 1,0 ^b

¹Médias dos quadrados mínimos

^{a,b} $P < 0,03$

O segundo experimento foi realizado com vacas Angus adultas (n = 56). O delineamento experimental foi semelhante ao empregado no experimento 1, exceto pelo objetivo adicional de comparar os efeitos das concentrações de progesterona sobre a qualidade do ovócito, com ou sem emprego de FSH para induzir o crescimento folicular (Figura 3). Para esse fim, todas as vacas foram sincronizadas para apresentar estro no mesmo dia do ciclo estral (estro = dia 0), a ablação folicular foi empregada para reiniciar as ondas foliculares (dia 5,5) e o estímulo ovariano com 40 mg de FSH foi realizado nos dias 7,5, 8, 8,5 e 9, antes da coleta de todos os folículos visíveis por OPU no dia 10,5. A segunda onda de crescimento folicular não foi estimulada com FSH e, conseqüentemente, a OPU foi realizada no dia 14,5, 4 dias após a OPU anterior. Portanto, neste experimento foi empregado o delineamento fatorial 2x2, tendo como efeitos principais a concentração de progesterona (L ou H) e FSH (+/-). No experimento 2, todos os ovócitos coletados com sucesso foram submetidos à PIV, que permitiu a avaliação da taxa de clivagem e de formação de blastocistos, além da inspeção da qualidade do embrião. A microscopia epifluorescente também foi empregada na determinação do número total de blastômeros e do número de blastômeros mortos.

Figura 2. Concentrações circulantes de progesterona (ng/mL) nas novilhas dos grupos de tratamento de progesterona alta e baixa no Experimento 1. As concentrações de progesterona diferiram ($P < 0,01$) a cada coleta após a ablação (dia 5,5)

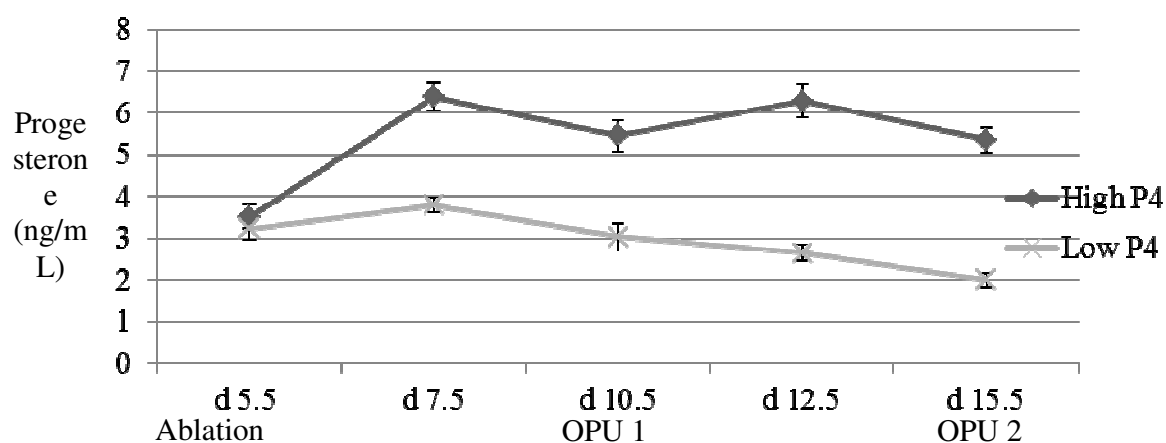


Figura 3. Delineamento do Experimento 2

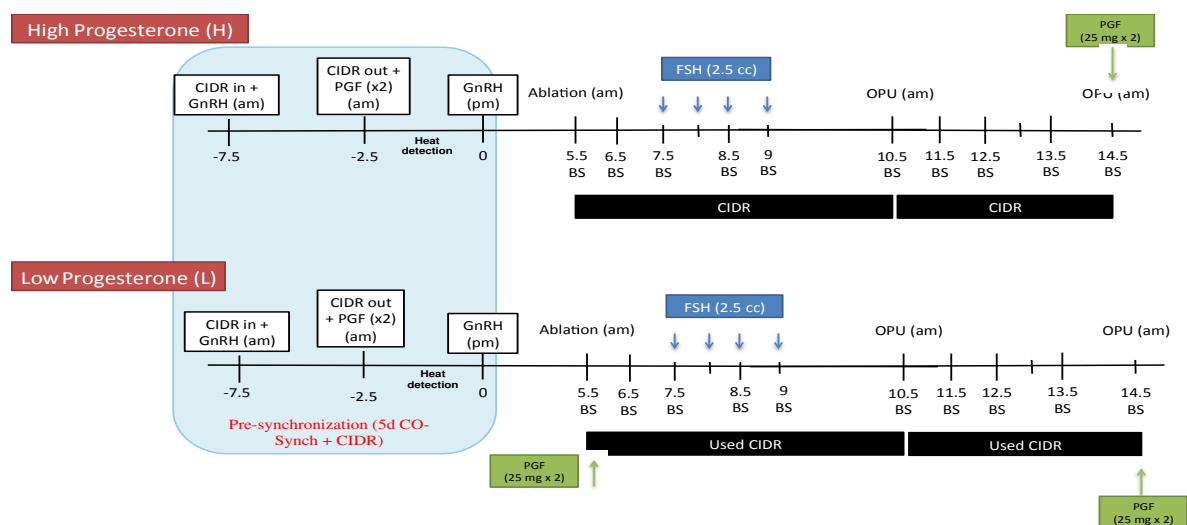
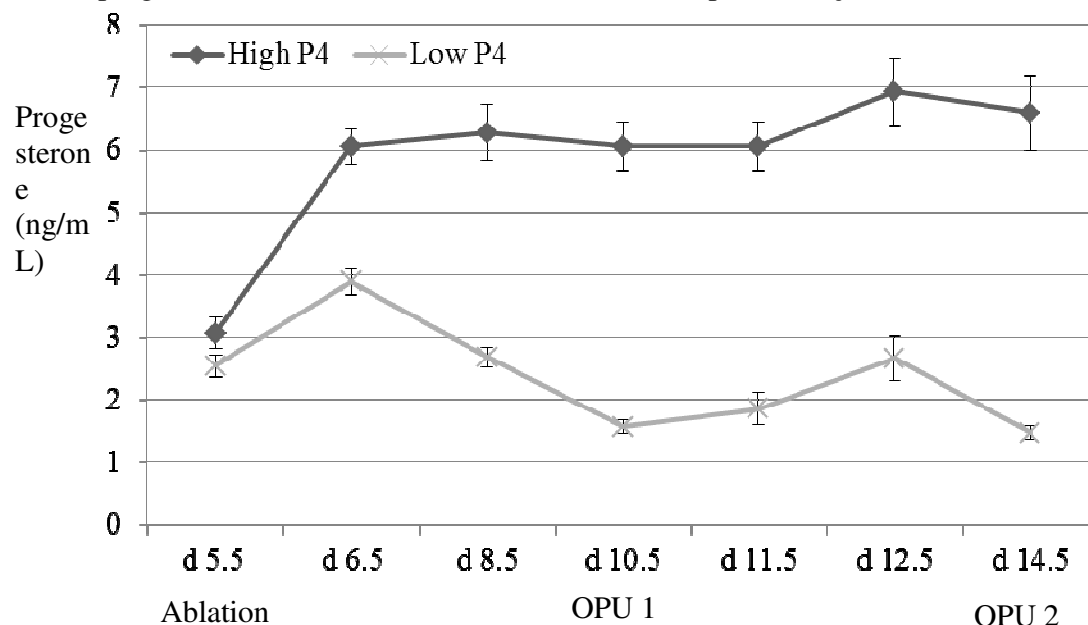


Figura 4. Concentrações circulantes de progesterona (ng/mL) nas vacas dos grupos de tratamento de progesterona alta e baixa no Experimento 2. As concentrações de progesterona diferiram ($P < 0,01$) a cada coleta após a ablação (dia 5,5)



Conforme esperado, as concentrações de progesterona diferiram ($P < 0,01$; Figura 4) entre os tratamentos a cada coleta após a ablação. A redução das concentrações de progesterona durante o desenvolvimento folicular resultou em um maior número de folículos no momento da OPU, independente da administração de FSH (Tabela 3). Entretanto, as concentrações de progesterona não influenciaram o número de ovócitos recuperados, a qualidade desses ovócitos à inspeção (Tabela 4), ou a sua capacidade de clivagem e desenvolvimento até o estágio de blastocisto após a PIV (Tabela 4). Embora a produção de blastocistos não tenha sido afetada pela concentração de progesterona, os embriões em estágio de blastocisto derivados de ovócitos coletados de vacas com baixas concentrações de progesterona apresentaram desenvolvimento mais avançado ($P < 0,05$), com maior número total de células ($P < 0,05$) do que os embriões em estágio de blastocisto derivados de ovócitos coletados de vacas expostas a altas concentrações de progesterona (Tabela 5). Com relação ao segundo objetivo, o número de folículos ($P < 0,001$) e o número de ovócitos recuperados ($P < 0,001$; Tabela 3) foram maiores nas vacas tratadas com FSH. Além disso, a administração de FSH resultou em um número maior de ovócitos de grau 1 a 3 por vaca ($P < 0,001$; Tabela 4), com tendência ($P = 0,06$) ao aumento da porcentagem de ovócitos de grau 1 a 3 por vaca.

Tabela 3. Efeito da Progesterona e do FSH sobre os Folículos Aspirados e os Ovócitos Recuperados por Vaca no Experimento 2¹

Tratamento	Progesterona		FSH	
	Alta (n = 50)	Baixa (n = 57)	Sim (n = 53)	Não (n = 54)
Folículos aspirados, n	19,0 ± 1,41 ^a	23,2 ± 1,31 ^b	25,1 ± 1,33 ^c	16,9 ± 1,32 ^d
Ovócitos recuperados, n	11,6 ± 3,85	13,0 ± 3,55	16,1 ± 3,75 ^c	8,5 ± 3,65 ^d

¹ Médias dos quadrados mínimos^{a,b} $P = 0,03$ ^{c,d} $P < 0,001$ **Tabela 4.** Efeito da Progesterona e do FSH sobre a Qualidade do Ovócito e a Produção de Embriões no Experimento 2

Tratamento	Progesterona		FSH	
	Alta	Baixa	Sim	Não
% Ovócitos de grau 1 a 3	63,6 (328/516)	65,5 (443/676)	67,0 ^c (531/792)	60,0 ^d (240/400)
Ovócitos de grau 1 a 3 por vaca	6,5 ± 0,69	7,7 ± 0,76	9,9 ± 0,94 ^a	4,3 ± 0,42 ^b
Clivagem, %	56,7% (244/430)	61,9% (337/544)	60,2% (380/631)	58,6% (201/343)
Blastocistos, %	19,3% (83/430)	22,1% (120/544)	22,2% (140/631)	18,4% (63/343)

^{a,b} $P < 0,001$ ^{c,d} $P = 0,06$ **Tabela 5.** Efeito da Progesterona e do FSH sobre as Características do Embrião no Experimento 2¹

Tratamento	Progesterona		FSH	
	Alta (n = 59)	Baixa (n = 57)	Sim (n = 76)	Não (n = 40)
Estágio Embrionário	5,1 ± 0,22 ^a	5,5 ± 0,18 ^b	5,3 ± 0,16	5,4 ± 0,24
Qualidade do Embrião	1,5 ± 0,10	1,3 ± 0,09	1,5 ± 0,08	1,4 ± 0,11
Células Mortas, n	5,1 ± 1,43	4,6 ± 1,11	5,3 ± 1,02	4,4 ± 1,54
Células Totais, n	78,6 ± 3,60 ^a	90,4 ± 3,31 ^b	80,6 ± 2,87	89,3 ± 4,18
Viáveis, %	92,9 ± 2,13	94,7 ± 1,54	92,8 ± 1,44	94,7 ± 2,24

¹ Médias dos quadrados mínimos^{a,b} $P < 0,05$

Em ambos os experimentos, 1 (novilhas) e 2 (vacas), a baixa concentração de progesterona durante o desenvolvimento folicular resultou em aumento do número de folículos ovarianos no momento da OPU. Não se sabe ao certo qual o motivo desse aumento, mas é possível que a queda dos níveis de progesterona tenha resultado em maior desenvolvimento folicular devido ao aumento da liberação de FSH, permitindo o recrutamento de maior número de folículos, ou que o baixo nível de progesterona tenha levado ao aumento da secreção de LH, com redução do número de folículos atresícos após o recrutamento. O aumento do número de ovócitos de grau 1 a 3 observado nas novilhas que receberam baixas doses de progesterona refletiu mais o maior número de folículos presentes no ovário no momento da OPU do que a melhora da qualidade dos ovócitos coletados devido às baixas concentrações de progesterona, uma vez que a proporção de ovócitos de grau 1 a 3 entre o todos os ovócitos coletados não diferiu entre os tratamentos em nenhum dos dois estudos. Embora tal resultado não reforce nossa hipótese de que a baixa concentração de progesterona melhore a qualidade do ovócito, o dado é importante do ponto de vista prático, uma vez que maior número total de ovócitos de grau 1 a 3 é desejável quando se realiza OPU.

No experimento 2, a taxa de clivagem do ovócito e de desenvolvimento de blastocistos não foi influenciada pela concentração de progesterona, o que pode em parte refletir as limitações inerentes ao emprego da PIV para mensurar a competência do ovócito. Neste estudo, todos os ovócitos coletados foram submetidos à PIV e as práticas características de produção envolvidas limitam os ovócitos aos graus 1 a 3, uma vez que ovócitos de graus 4 a 6 apresentam taxas de formação de blastocistos entre 0 e 6% (Blondin et al., 1996). A inclusão de todos os ovócitos foi realizada para evitar vieses caso houvesse diferença no grau dos ovócitos entre os tratamentos. Embora a taxa de clivagem e de formação de blastocistos não tenham diferido entre os tratamentos, os embriões derivados de vacas do grupo de tratamento com baixos níveis de progesterona apresentaram estágio mais avançado de desenvolvimento e maior número de células no dia 7, o que pode refletir melhora na qualidade dos ovócitos das fêmeas do grupo de tratamento de baixa progesterona. Apesar do baixo número de estudos envolvendo comparações semelhantes, Chaubal et al. (2007), empregando um modelo animal semelhante ao nosso e vacas tratadas com LH antes da OPU, relataram que os ovócitos das vacas que não receberam CIDR geraram quase o dobro do número de blastocistos do que os ovócitos das vacas que receberam CIDR. Apesar das diferenças de resultados, isso reforça a idéia de que ambientes pobres em progesterona antes da OPU e durante o desenvolvimento folicular possam melhorar a qualidade do ovócito e aumentar o número de blastocistos gerados. Além disso, no estudo de Chaubal et al. (2007), o número de folículos aspirados e ovócitos coletados não diferiu entre as vacas que receberam ou não CIDR. Portanto, o maior número de blastocistos gerados após a PIV provavelmente refletiu a melhor qualidade dos ovócitos das vacas que não receberam CIDR. Os motivos por trás das diferenças entre os resultados deste estudo e do estudo de Chaubal et al. (2007) não foram esclarecidos e novas pesquisas voltadas para a investigação direta do papel das concentrações de progesterona e de gonadotrofinas na qualidade do ovócito se fazem necessárias.

Do ponto de vista prático, os resultados desses experimentos têm implicações na IPV e na transferência de embriões. Em bovinos, embriões produzidos *in vitro* são mais baratos do que embriões produzidos *in vivo* e são requisitados tanto para uso em vacas de corte como em vacas

leiteiras. Além disso, a transferência de embriões produzidos *in vitro* que não submetidos ao congelamento resulta em taxas aceitáveis de prenhez (53,8%, 1.220/2.268; Hasler et al., 1995). Segundo os relatos mais frequentes da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, o número total de embriões bovinos viáveis produzidos *in vitro* aumentou no mundo todo desde 2000 (Stroud, 2010), com crescimento de 19,7% entre 2009 e 2010. Espera-se que o número de transferências de embriões produzidos *in vitro* continue a crescer, acompanhando a evolução das tecnologias de OPU e PIV. Consequentemente, os resultados deste estudo podem afetar o manejo das doadoras submetidas à OPU. Em bovinos de corte, pode ser melhor desenvolver protocolos de OPU que promovam um perfil endócrino com baixos níveis de progesterona durante o desenvolvimento da onda folicular. Nossos resultados e os de outros pesquisadores (Chaubal et al., 2007) sugerem que tal abordagem pode aumentar o número de ovócitos recuperados e a produção e/ou qualidade dos blastocistos gerados. Novas pesquisas se fazem necessárias para confirmar tais especulações. Além disso, o Brasil é líder na área de PIV e transferência de embriões, respondendo por quase 80% das atividades mundiais relacionadas à PIV. Os resultados descritos se referem a bovinos *Bos taurus*, porém acredita-se que resultados semelhantes possam ser obtidos em bovinos *Bos indicus* e mereçam ser investigados, uma vez que os procedimentos de OPU e PIV são empregados com maior frequência nesses animais.

Importância da Progesterona Após a Inseminação

O papel da progesterona na promoção do crescimento embrionário e na sobrevivência do embrião após a fertilização é bem conhecido. Já foi repetidamente demonstrado que as concentrações de progesterona no início da gestação são mais altas em vacas prenhes do que em vacas vazias ao diagnóstico de gestação (Johnson, 1958; Robinson et al., 1989; Starbuck et al., 2001). Além disso, as concentrações de progesterona no início da gestação podem influenciar diretamente a probabilidade de sobrevivência ou perda embrionária (Starbuck et al., 2004). Em novilhas de corte, Diskin et al. (2006) demonstraram uma relação linear positiva e quadrática entre as concentrações circulantes de progesterona e a sobrevivência do embrião. Em um estudo clássico, Garrett et al. (1988) demonstraram que as concentrações de progesterona afetam o crescimento do conceito e que concentrações mais altas de progesterona geram conceitos maiores. A elevação das concentrações de progesterona e o estímulo subsequente do desenvolvimento do conceito no início da gestação podem favorecer o sucesso da prenhez por melhorar a capacidade do conceito de sinalizar o reconhecimento materno da prenhez (RMP). A produção insuficiente de interferon-tau (IFNt) pelo conceito foi incriminada como o principal fator envolvido na perda embrionária precoce em bovinos (Mann et al., 1999), uma vez que o IFNt corresponde ao fator de sinalização do RMP produzido pelo conceito. Uma forte correlação entre as concentrações circulantes de progesterona e a secreção de IFNt foi demonstrada (Kerbler et al., 1997). Além disso, Mann e Lamming (2001) e Mann et al. (2006) observaram que conceitos maiores produzem mais IFNt. Mann et al. (2006) também demonstraram uma associação significativa entre o comprimento do conceito e as concentrações uterinas de IFNt ($R^2 = 0,83$). Conforme o desenvolvimento do conceito progride durante o alongamento, a expressão de RNAm para IFNt pelas células trofoblásticas não aumenta. Em contrapartida, conforme o conceito se alonga, um número maior de células trofoblásticas leva ao aumento da quantidade total de IFNt no útero (Robinson et al., 2006).

Recentemente, Clemente et al. (2009) demonstraram a presença do RNAm para receptor de progesterona em todos os estágios do desenvolvimento embrionário. Entretanto, o estímulo do

desenvolvimento embrionário pela progesterona não parece ser devido a efeitos diretos sobre o embrião, mas ao aumento da secreção de vários fatores voltados para o estímulo do desenvolvimento embrionário (histotrofo) desencadeado pela presença de altas concentrações de progesterona (Spencer e Bazer, 2002; Satterfield et al., 2006). O endométrio produz e secreta uma ampla gama de fatores necessários para o desenvolvimento e a sobrevivência do embrião. Tais fatores promovem o desenvolvimento embrionário e as alterações da membrana celular que facilitam a aderência do conceito e do endométrio, coordenam a fixação do conceito ao endométrio e modulam a reposta imune materna, permitindo a aceitação do conceito em desenvolvimento (Spencer e Bazer, 2002; Spencer et al., 2004). A produção e secreção de tais fatores são reguladas pela expressão e sub-regulação de vários genes no útero. As concentrações de progesterona no início da gestação afetam a expressão gênica global no endométrio, ou transcriptoma (Bauersachs et al., 2006). A alteração das concentrações de progesterona tem o potencial de alterar o transcriptoma uterino, causando disfunção uterina e reduzindo as chances de sobrevivência do conceito devido à alteração das secreções uterinas (McNeill et al., 2006; Forde et al., 2011). Portanto, a manipulação das concentrações de progesterona, como no caso da alteração do tamanho e qualidade do folículo ovulatório e do CL subsequente, pode afetar diretamente a probabilidade de sobrevivência do embrião.

Dada a importância da presença de altas concentrações de progesterona no início da prenhez para o RMP e o crescimento e sobrevivência do embrião, diversos estudos foram realizados para investigar a capacidade da progesterona exógena de melhorar as taxas de prenhez em bovinos. O principal objetivo de tais estudos era aumentar as concentrações circulantes de progesterona e várias abordagens foram adotadas em bovinos com essa finalidade, incluindo a administração direta de injeções diárias de progesterona, a implantação de dispositivos de liberação de progesterona, como os CIDR, e a indução da ovulação de um segundo folículo através da administração de GnRH, eCH ou hCG, para se obter um segundo CL, aumentando assim as concentrações de progesterona. Mais de 50 anos atrás, Johnson (1958) conseguiu aumentar as taxas de concepção ao primeiro serviço de 42% para 68% empregando injeções de 100 mg de progesterona nos dias 2, 3, 4 e 9 após a IA em vacas leiteiras. Um aumento semelhante foi observado em vacas Holandesas que receberam um dispositivo intrauterino de liberação de progesterona nos dias 5 a 12 ou 10 a 17 após a IA (Robinson et al., 1989). Starbuck e colaboradores (2001) também documentaram melhora das taxas de sobrevivência embrionária mediante a suplementação de progesterona em vacas leiteiras com risco de perda embrionária por deficiência de progesterona. Embora alguns pesquisadores tenham observado melhoras da fertilidade com a suplementação de progesterona durante o desenvolvimento embrionário precoce, outros falharam em demonstrar os mesmos resultados (Mann e Lamming, 1999; Lamb et al., 2010; Wiltbank et al., 2012). Com base nas informações disponíveis, Mann e Lamming (1999) concluíram que a suplementação de progesterona melhora as taxas de prenhez em 5%, mas que tal melhora depende dos dias de suplementação e da fertilidade relativa dos rebanhos tratados. O motivo da discrepância entre a melhora da fertilidade em bovinos com altas concentrações de progesterona documentada em estudos observacionais e a variabilidade de resultados relativos à fertilidade após a suplementação de progesterona não foram esclarecidos. A duração da exposição, as diferenças entre as concentrações circulantes e as observadas nos diferentes órgãos e tecidos e o modo de administração podem contribuir para a variabilidade das respostas de fertilidade após a administração de progesterona exógena.

Resumo

As concentrações circulantes de progesterona antes e depois da ovulação podem afetar a fertilidade em bovinos. O papel das concentrações pré e pós-ovulatórias de progesterona e seus efeitos sobre a fertilidade requerem investigações adicionais. Em animais *Bos indicus*, a redução das concentrações de progesterona durante o desenvolvimento do folículo ovulatório parece melhorar a fertilidade. Baixas concentrações de progesterona possivelmente aumentam a liberação de LH, melhoram o desenvolvimento folicular e aumentam a produção de estradiol, podendo afetar diretamente a qualidade do ovócito. Em bovinos de corte *Bos taurus*, os benefícios de baixas concentrações de progesterona antes da ovulação não foram definidos, embora o assunto venha sendo estudado em nosso laboratório. Após a ovulação, a presença de altas concentrações de progesterona durante o desenvolvimento embrionário precoce é fundamental. As concentrações de progesterona afetam a função uterina e, consequentemente, o crescimento do embrião. Uma maior compreensão do papel das concentrações pré e pós-ovulatórias de progesterona é muito importante para reduzir as perdas embrionárias precoces e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas na administração exógena de progesterona para garantir a competência ideal do ovócito no momento da ovulação, o desenvolvimento adequado do conceito e a manutenção da prenhez.

Referências Bibliográficas

- Adams, G.P., R.L. Matteri, and O.J. Ginther. 1992. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 96:627.
- Aller, J.F., N.C. Mucci, G.G. Kaiser, S.S. Callejas, and R.H. Alberio. 2012. Effect of repeated eCG treatments and ovum pick-up on ovarian response and oocyte recovery during early pregnancy in suckling beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* 133:10.
- Aparicio, I.M., M. Garcia-Herreros, L.C. O'Shea, C. Hensey, P. Lonergan, and T. Fair. 2011. Expression, regulation and function of genomic and non-genomic progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during *in vitro* maturation. *Biol. Reprod.* 84:910.
- Baruselli, P.S., M.O. Marques, L.F. Nasser, E.L. Reis, and G.A. Bo. 2003. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-b devices for timed artificial insemination. *Theriogenology* 59:214. (Abstr.).
- Bauersachs, S., S.E. Ulbrich, K. Gross, S.E. Schmidt, H.H. Meyer, H. Wenigerkind, M. Vermehren, F. Sinowatz, H. Blum, and E. Wolf. 2006. Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction.* 132:319.
- Blondin, P., K. Coenen, L.A. Guilbault, and M.A. Sirard. 1996. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology.* 46:1191.
- Bisinotto, R.S., R.C. Chebel, and J.E. Santos. 2010. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 93:3578.

- Bridges, G.A., M.L. Mussard, C.R. Burke, and M.L. Day. 2010. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 117:208.
- Carvalho, J.B.P., N.A.T. Carvalho, E.L. Reis, M. Nichi, A.H. Souza, and P.S. Baruselli. 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*. 69:167.
- Cerri, R.L., H.M. Rutigliano, R.G. Bruno, and J.E. Santos. 2009. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. *Anim. Reprod. Sci.* 110:56.
- Cerri, R.L., R.C. Chebel, F. Rivera, C.D. Narciso, R.A. Oliveira, M. Amstalden, G.M. Baez-Sandoval, L.J. Oliveira, W.W. Thatcher, and J.E. Santos. 2011. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. *J Dairy Sci.* 94:3352.
- Chaubal, S.A., L.B. Ferre, J.A. Molina, D.C. Faber, P.E.J. Bols, P. Rezamand, X. Tian, and X. Yang. 2007. Hormonal treatments for increasing the oocytes and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology* 67:719.
- Claro, I. Jr., O.G. Sa Filho, R.F. Peres, F.H. Aono, M.L. Day, and J.L. Vasconcelos. 2010. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus* heifers after progesterone-based treatments. *Theriogenology*. 74:903.
- Clemente, M., J. de La Fuente, T. Fair, A. Al Naib, A. Gutierrez-Adan, J.F. Roche, D. Rizos, and P. Lonergan. 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction*. 138:507.
- Denicol, A.C., G. Lopes Jr., L.G. Mendonca, F.A. Rivera, F. Guagnini, R.V. Perez, J.R. Lima, R.G. Bruno, J.E. Santos, and R.C. Chebel. 2012. Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:1794.
- Dias, C.C., F.S. Wechsler, M.L. Day, and J.L. Vasconcelos. 2009. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F(2alpha) treatment affect fertility in postpubertal Nelore heifers. *Theriogenology*. 72:378.
- Dieleman, S.J., M.M. Bevers, J. Poortman, and H.T. van Tol. 1983. Steroid and pituitary hormone concentrations in the fluid of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH in the peripheral blood. *J. Reprod. Fertil.* 69:641.
- Diskin, M.G., D.G. Morris. 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domes Anim.* 43:260.
- Diskin, M.G., J.J. Murphy, and J.M. Sreenan. 2006. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 96:297.
- Diskin, M.G., M. H. Parr, and D. G. Morri. 2012. Embryo death in cattle: an update. *Reprod.*

Fertil. Dev. 24:244.

Driancourt, M.A., B. Thuel, P. Mermillod and P. Lonergan. 1998. Relationship between oocyte quality (measured after IVM, IVF, and IVC of individual oocytes) and follicle function in cattle. *Theriogenology*. 1:345.

Forde, N., M.E. Beltman, G.B. Duffy, P. Duffy, J.P. Mehta, P. O'Gaora, J.F. Roche, P. Lonergan, and M.A. Crowe. 2011. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biol. Reprod.* 84:266.

Garrett, J.E., R.D. Geisert, M.T. Zavy, G.L. Morgan. 1988. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J. Reprod. Fertil.* 84:437.

Ginther, O.J. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:61.

Gong, J.G., T.A. Bramley, C.G. Gutierrez, A.R. Peters, and R. Webb. 1995. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 105:263.

Hasler, J.F., W. B. Henderson, P.J. Hurtgen, Z. Q. Jin, A.D. McCauley, S.A. Mower, B. Neely, L.S. Shuey, J.E. Stokes, and S.A. Trimmer. 1995. Production, freezing, and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43:141-152.

Johnson, K.R. 1958. Effect of 17 alpha-hydroxyprogesterone 17-n-caproate on the reproductive performance of cattle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 71:577.

Kerbler, T.L., M.M. Buhr, L.T. Jordan, K.E. Leslie, and J.S. Walton. 1997. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology*. 47:703.

Kinder, J.E., F.N. Kojima, E.G.M. Bergfeld, M.E. Wehrman, and K.E. Fike. 1996. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J. Anim. Sci.* 74: 1424.

Kojima, N., T. T. Stumpf, A. S. Cupp, L.A. Werth, M.S. Roberson, M.W. Wolfe, R.J. Kittok, and J.E. Kinder. 1992. Exogenous progesterone and progestins as used in estrous synchrony regimens do not mimic the corpus luteum in regulation of luteinizing hormone and 17 beta-estradiol in circulation of cows. *Biol. Reprod.* 47:1009.

Lamb, G. C., C. R. Dahlen, J. E. Lason, G. Marquezini, and J. S. Stevenson. 2010. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 88(E-Suppl.):E181-E192.

Li, Q., F. Jimenez-Krassel, A. Bettgowda, J.J. Ireland, G.W. Smith. 2007. Evidence that the preovulation rise in intrafollicular progesterone may not be required for ovulation in cattle. *J. Endocrinol.* 192:47.

Mann, G. E. and G. E. Lamming. 1999. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 34:269-274.

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

Mann, G. E., M. D. Fray, and G. E. Lamming. 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. *Vet. J.* 171:500-503.

Mauer, R.R., and S.E. Echternkamp. 1982. Hormonal asynchrony and embryonic development. *Theriogenology*. 17:11.

McNeill, R.E., J.M. Sreenan, M.G. Diskin, M.T. Cairns, R. Fitzpatrick, T.J. Smith, and D.M. Morris. 2006. Effect of progesterone concentration on the expression of progesterone-responsive genes in the bovine endometrium during the early luteal phase. *Reprod. Fertil. Dev.* 18:573.

Meneghetti, M., O.G. Sá Filho, R.F. Peres, G.C. Lamb, and J.L. Vasconcelos. 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. *Theriogenology* 72:179.

Mussard, M.L., C.R. Burke, E.J. Behlke, C.L. Gasser, and M.L. Day. 2007. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. *J Anim Sci.* 85:937.

Oussaid, B., J.C. Mariana, N. Poulin, J. Fontaine, P. Lonergan, J.F. Beckers, and Y. Cognie. 1999. Reduction of the developmental competence of sheep oocytes by inhibition of LH pulses during the follicular phase with a GnRH antagonist. *J. Reprod. Fertil.* 117:71.

Perry, G.A., M.F. Smith, M.C. Lucy, J.A. Green, T.E. Parks, M.D. MacNeil, A.J. Roberts, and T.W. Geary. 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:5268.

Perry, G.A., M.F. Smith, M.C. Lucy, A.J. Roberts, M.D. MacNeil, and T.W. Geary. 2003. Effect of ovulatory follicle size at the time of GnRH injection or standing estrus on pregnancy rates and embryonic/fetal mortality in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 81 (Suppl. 1):52. (Abstr.)

Rahe, C.H., R.E. Owens, J. L. Fleeger, H.J. Newton, and P.G. Harms. 1980. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: Dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology* 107:498.

Robinson, N.A., K.E. Leslie, and J.S. Walton. 1989. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. *J. Dairy. Sci.* 72:202.

Robinson, R. S., M. D. Fray, D. C. Wathes, G. E. Lamming, and G. E. Mann. 2006. In vivo expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. *Mol. Reprod. Dev.* 73:470-474.

- Sá Filho, O.G., R. Meneghetti, R.F. Peres, G.C. Lamb, and J.L. Vasconcelos. 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology* 79:210.
- Sangsritavong, S., D.K. Combs, R. F. Sartori, L.E. Armentano, and M.C. Wiltbank. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol 17 β in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 85:2831.
- Santos, J.E., W.W. Thatcher, L. Pool, M.W. Overton. 2001. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79:2881.
- Sartori, R., J.M. Haughian, R.D. Shaver, G.J.M. Rosa, and M.C. Wiltbank. 2004. Comparison of ovarian functions and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactation cows. *J. Dairy Sci.* 87:905.
- Satterfield, M.C., F. W. Bazer, and T.E. Spencer. 2006. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biol. Reprod.* 75:289.
- Savio, J.D., W.W. Thatcher, G.R. Morris, K. Entwistle, M. Drost, and M.R. Mattiacci. 1993. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing device on follicular turnover and fertility in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 98:77.
- Schallenberger, E., D. Schams, B. Bullermann, and D.L. Walters. 1984. Pulsatile secretion of gonadotropins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during prostaglandin-induced regression of the corpus luteum in the cow. *J. Reprod. Fert.* 71:493.
- Schallenberger, E., A.M. Schöndorfer, and D. L. Walters. 1985. Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle. I. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein throughout the oestrous cycle. *Acta Endocrinologica* 108:312.
- Siqueira, L.C., M.H. Barreta, B. Gasperin, R. Bohrer, J.T. Santos, J.J. Buratini, J.F. Oliveira, and P.B. Goncalves. 2012. Angiotensin II, progesterone, and prostaglandins are sequential steps I the pathway to bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology.* 77:1779.
- Sirois, J., and J.E. Fortune. 1990. . Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: A model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology.* 127:916.
- Spencer, T. E., and F. W. Bazer. 2002. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front. Biosci.* 7:d1879-d1898.
- Starbuck, G.R., A. O. Darwash, G.E. Mann, and G.E. Lamming. 2001. The detection and treatment of post-insemination progesterone insufficiency in dairy cows. *BSAS Occas. Pub.* 26:447.
- Stroud, B. 2010. IETS statistics and data retrieval committee report; The year 2009 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter* 2010;28:11-21.

- Taft, R, N. Ahmad, and K. Inskeep. 1996. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. *J. Anim. Sci.* 74:2985.
- Van de Leemput, E.E., J.M. van der Schans, P.L.A.M. Vos, M.M. Bevers, and S.J. Dieleman. 1998. Follicular function as defined by estradiol-17 β production determines in vitro developmental capacity of bovine oocytes derived from preovulatory-sized follicles. *Theriogenology*. 1:300.
- Vasconcelos, L.M., E.R. Vilela, and O.G. Sa Filho. 2009. Temporary weaning at two different time of the GnRH-PGF_{2 α} -EB synchronization of ovulation protocol in post partum Nelore cows. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.* 61:95.
- Vasconcelos, L.M., R. Sartori, H.N. Oliveira, J.N. Guenther, and M.C. Wiltbank. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rates. *Theriogenology*. 56:307.
- Wiltbank, M.C., A. Gumen, and R. Sartori. 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*. 57:21.
- Wiltbank, M. C., A. H. Souza, P. D. Carvalho, R. W. Bender, and A. B. Nascimento. 2012. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 24:238-243.