

## Produção e metabolismo da progesterona e seu papel antes, durante e depois da inseminação artificial influenciando a fertilidade de vacas leiteiras de alta produção

Progesterone Production and Metabolism and Its Role Before, during and after Artificial Insemination Influencing the Fertility of High Producing Dairy Cows

Anibal Ballarotti do Nascimento<sup>1</sup>, Alexandre Henrily de Souza<sup>2</sup>,  
Roberto Sartori<sup>1</sup> & Milo Charles Wiltbank<sup>2</sup>

### ABSTRACT

**Background:** Efficient reproduction performance is important for optimal profitability on dairy operations. Unfortunately, most dairy farms do not attain optimal reproduction due to many factors including management, health, and physiology of high-producing dairy cows. The physiology limitations involved in reproduction of lactating dairy cows are complex and becoming worse as milk production increases. But many variables related to the interactions between nutrition, the complexity of some hormonal systems, and altered reproductive patterns in dairy cattle have been elucidated. This review will focus on the role of progesterone (P4) in reproduction of the lactating dairy cow.

**Review:** Progesterone is a steroid hormone primarily secreted by the corpus luteum (CL) and placenta. Adequate circulating P4 concentrations are essential for establishment and maintenance of pregnancy. Thus, because of the central role of progesterone on fertility, this manuscript reviews the effect of progesterone (P4) during timed AI protocols in lactating dairy cows. Two sections summarize how P4 is produced and a model attempts to explain how P4 is metabolized in high producing dairy cows. Circulating P4 is determined by a balance between P4 production and P4 metabolism and stimulatory and inhibitory pathways regulating this balance are complex. However in dairy cattle, the volume of luteal tissue is a primary factor regulating P4 production; although, inadequate P4 is generally due to high metabolism of P4 resulting from extremely elevated liver blood flow. If P4 production is increased by an increase in luteal tissue without a change in liver blood flow, then circulating P4 will increase. Conversely, if there is an increase in liver blood flow then there will be a corresponding decrease in circulating P4 even though P4 production has not been altered. Thus, an understanding of regulation of circulating P4 must carefully consider the factors regulating P4 production and its metabolism. As will be discussed below, over 80% of P4 production during the estrous cycle of the cow is due to constitutive P4 production by the large luteal cell. Regulation of constitutive P4 production by the CL does not appear to require stimulatory pathways but can be dramatically decreased during luteolysis induced by exogenous or endogenous prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ). Conversely, although liver enzymes involved in P4 metabolism can be regulated, we speculate in this model that the primary determinant of P4 metabolism in the lactating cow is related to the rate of liver blood flow. These concepts are more fully discussed below. Three sections summarize the role of P4 concentrations prior to breeding, near the time of breeding, and after breeding. During timed AI protocols, elevations in P4 are achieved by increasing number of CL by ovulation of accessory CL or by supplementation with exogenous P4. Elevating P4 prior to the timed AI generally decreases double ovulation and can increase fertility to the timed AI. Near the time of AI, slight elevations in circulating P4 can dramatically reduce fertility with inadequate luteolysis to the PGF2 $\alpha$  treatment prior to timed AI, being the underlying cause of this problem. After AI, circulating P4 is critical for embryo growth and establishment and maintenance of pregnancy. Many studies have attempted to improve fertility by elevating P4 after timed AI with primarily marginal elevations (<5%).

**Conclusion:** Previous research has provided substantial insight into mechanisms regulating circulating P4 concentrations and actions. Understanding this prior research can focus future studies on P4 manipulation to improve timed AI protocols.

**Keywords:** progesterone, production, metabolism, artificial insemination, fertility.

**Descritores:** progesterona, produção, metabolismo, inseminação artificial, fertilidade.

## I. INTRODUÇÃO

## II. PROGESTERONA: PRODUÇÃO

## III. PROGESTERONA: METABOLIZAÇÃO

## IV. IMPORTÂNCIA DA ALTA P4 ANTES DA IA

## V. IMPORTÂNCIA DA BAIXA P4 PRÓXIMO DO MOMENTO DA IA

## VI. IMPORTÂNCIA DA ALTA P4 APÓS A IA

## VII. CONCLUSÕES

## VIII. REFERÊNCIAS

### I. INTRODUÇÃO

A concentração circulante de P4 no organismo é determinada pela razão entre sua produção pelo CL, e, por outro lado, pelo seu metabolismo nas células hepáticas. Nas vacas leiteiras de alta produção existe um desbalanço nesta equação, pois a P4 produzida é rapidamente metabolizada por uma taxa extremamente alta de fluxo sanguíneo que passa através do fígado. Diferentes abordagens para manipular a concentração circulante de P4, e em momentos diferentes em relação a IA, têm sido realizadas no intuito de compreender e, então, de compensar este desbalanço na P4 circulante causado pelos altos níveis de produção de leite.

Em geral, o aumento da P4 antes da IA é obtido através da indução de uma ovulação extra, produzindo um CL acessório ou pela inserção de dispositivo intravaginal de liberação de P4 [39]. Entretanto, é importante que, após este aumento durante o crescimento folicular antes da IA, ocorra uma rápida diminuição dos níveis de P4 próximo ao momento da ovulação através de uma luteólise adequada, de maneira que os índices de fertilidade não sejam prejudicados [52]. Após a IA, altos níveis de P4 são importantes para que haja crescimento embrionário e este produza níveis adequados de intérféron-tau para o reconhecimento materno da gestação. Muitos estudos têm demonstrado aumento nas taxas de fertilidade com a suplementação de P4 após a IA, mas isto tem ocorrido apenas em determinadas categorias de vacas [39]. A compreensão da exata influência da P4 sobre estes três momentos relativos a IA ainda não é bem conhecida. Por isso, as discussões acerca de protocolos mais eficientes de IA em tempo fixo (IATF) devem considerar a influência da P4 e de suas ações não apenas durante o protocolo em si ou no momento da inseminação, mas também durante o período pré e pós IATF.

Os objetivos da presente revisão incluem aspectos relacionados à produção e ao metabolismo da P4, o papel da alta P4 antes da IA, da importância da baixa P4 no momento próximo a IA e a subsequente elevação após a IA e seus impactos sobre os índices de fertilidade de vacas leiteiras de alta produção.

### II. PROGESTERONA: PRODUÇÃO

O primeiro e mais óbvio fator que regula a concentração circulante de P4 é a sua produção endógena. O principal tecido no organismo que produz P4 em vacas no início do ciclo estral normal seguido ou não de prenhez é o corpo lúteo (CL). Os mecanismos envolvidos na produção de P4 pelo CL de ruminantes estão bem descritos [19] e serão revisados nesta seção.

Há apenas duas principais enzimas e uma proteína carreadora envolvidas na produção de P4 a partir do colesterol. A primeira enzima é conhecida como enzima P450 de clivagem de colesterol em cadeia (CYP11A1), que se localiza no interior das membranas mitocondriais e convertem o colesterol em pregnenolona. A pregnenolona por sua vez é convertida em P4 pela ação da enzima 3B-hidroxiesteroide desidrogenase (HSD3B), localizada no retículo endoplasmático das células. Entretanto, para que isto ocorra, o colesterol precisa se mover através das membranas mitocondriais e esta tarefa não é necessariamente fácil. Esta dificuldade da mobilidade do colesterol para o interior das mitocôndrias é devida à constituição de bicamada lipídica da parede mitocondrial e outras membranas celulares e à própria constituição do colesterol, que apresenta somente uma região hidrofílica simples com o restante da molécula sendo hidrofóbica. Assim, o principal fator limitante na produção de P4 é o transporte do colesterol para o interior da membrana mitocondrial, quando o colesterol poderá interagir com a enzima CYP11A1 e originar a pregnenolona. O movimento do colesterol para dentro da membrana mitocondrial é mediado por um mecanismo de transporte regulado pela produção de uma proteína de transporte, a proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR). Em síntese, o mecanismo para a síntese de P4 a partir do colesterol envolve o transporte do colesterol para dentro da membrana mitocondrial pela StAR, conversão do colesterol a pregnenolona pela CYP11A1 e, finalmente, pela conversão da pregnenolona a P4 pela HSD3B.

Apesar do crescimento do CL ser a principal razão para o aumento da P4 circulante durante o iní-

cio do ciclo estral, não há uma relação precisa entre o tamanho do CL e a produção de P4. Esta falta de precisão entre tamanho de CL e concentração de P4, ocorre devido a drásticas diferenças entre o metabolismo de diferentes categorias animais, como será descrito em seguida. Além disso, a regressão do CL tem uma redução mais precoce na produção de P4 do que na diminuição do seu tamanho, portanto, um CL com tamanho substancial pode ser associado a uma baixa concentração de P4 durante um determinado período durante o fim do ciclo estral [47].

O CL funcional tem uma produção extraordinariamente alta de P4 por unidade de tecido luteal com taxas ao redor de  $10^{16}$  moléculas de P4 produzidas por grama de tecido [33,72]. Com base em cálculos farmacológicos de produção de P4 em CL gestacional, vacas de alta produção em lactação apresentam taxa de produção de P4 da ordem de 13,5 mg por hora (taxa de clearance metabólico de 2700 L/h X 5 ng/mL de concentração de P4 = 13,5 mg de P4 metabolizado por hora, que seria também igual à produção de P4 por hora em estabilidade) [55].

Esta extraordinária taxa de produção de P4 pelo CL é devida, principalmente, a dois fatores. Primeiro, há uma elevada quantidade de colesterol disponível para o CL devido a uma alta concentração sanguínea de lipoproteínas de alta densidade (HDL) entre os ruminantes. Este HDL está prontamente disponível para ser utilizado pelo CL, que é provido por elevado fluxo sanguíneo. Segundo, as duas enzimas essenciais para a produção de P4, CYP11A1 e HSD3B, somadas a proteína carreadora StAR estão disponíveis em quantidades também extraordinárias no CL [19]. Estas três proteínas aumentam drasticamente após a luteinização do folículo e desenvolvimento luteal [19]. Assim, a produção de P4 pelo CL é diretamente proporcional ao seu desenvolvimento e volume final.

Mais de 80% da produção de P4 pelo CL de ruminantes é devida à ação das células luteais grandes (CLG) [49]. As CLG são originadas a partir das células da granulosa do folículo ovulado. As células da granulosa medem apenas cerca de 10  $\mu\text{m}$  no folículo pré-ovulatório, mas, após o pico de LH e subsequente luteinização, elas passam a medir cerca de 38  $\mu\text{m}$ , ou seja, um crescimento de mais de 50 vezes (de 500  $\mu\text{m}^3$  para 30.000  $\mu\text{m}^3$ ) sobre o volume celular. Embora as CLG representem apenas 4% do total das células luteais, seu grande volume representa cerca de 40% do

volume total do CL [50]. Este tipo celular, altamente diferenciado para trabalhar como uma fábrica eficiente de P4, parece constituído para funcionar de forma acelerada durante toda a sua vida útil, entretanto, estas células do CL são desativadas facilmente pela ação da  $\text{PGF}2\alpha$  durante a luteólise, mecanismo regulatório no qual não se entrará em detalhes na presente revisão.

### III. PROGESTERONA: METABOLIZAÇÃO

O papel da ingestão alimentar sobre o metabolismo de P4 foi primeiro descrito em suínos [13] e em ovinos [51]. Nos estudos iniciais com ovinos, foi demonstrado que, conforme se aumentou a ingestão alimentar, houve aumento no fluxo sanguíneo hepático e diminuição das concentrações circulantes de P4. Nosso grupo vem estudando este mecanismo em vacas leiteiras, correlacionando o volume de ingestão de matéria seca com o aumento do fluxo sanguíneo hepático e a consequente diminuição na concentração circulante de P4 e ainda de estradiol-17 $\beta$  [56,79]. Para continuar os estudos da relação entre produção e metabolismo de P4, vacas HPB de alta produção, em lactação ou secas, foram agrupadas com mesmo peso e idade. O grupo de vacas em lactação mais do que dobrou a taxa de fluxo sanguíneo com relação ao grupo de vacas secas. Consequentemente, a taxa de clearance metabólico de P4 e de estradiol-17 $\beta$  foi mais alta nas vacas em lactação do que nas vacas secas, provavelmente devido ao aumento na taxa de fluxo sanguíneo hepático. Ainda, quando foi realizada a infusão de igual quantidade de P4 em vacas lactantes ou secas, a taxa de metabolismo das vacas lactantes foi superior quando comparadas com as das vacas secas. Ou seja, vacas com mesma produção endógena de P4, mas com diferentes níveis de produção de leite ou ausência de produção, provavelmente terão diferentes taxas de clearance metabólico de hormônios esteroides [79].

O mecanismo fisiológico por trás da diminuição da circulação da P4 parece relativamente simples [79]. Se assumirmos que qualquer quantidade de sangue contendo P4 que passa através do fígado, tem toda a P4 metabolizada (100% de metabolismo da P4 no fígado), então qualquer aumento na produção de P4 também corresponderia a um aumento na taxa de metabolismo hepático de P4. O fluxo sanguíneo que passa através do fígado é proveniente de dois principais vasos, a artéria hepática e a veia porta. A veia porta contém quase todo o sangue proveniente do trato

digestivo. Qualquer aumento no fluxo sanguíneo do trato digestivo, irá necessariamente aumentar o fluxo sanguíneo através da veia porta e conseqüentemente irá aumentar a taxa de metabolismo da P4 tão somente pelo aumento da P4 passando (e sendo metabolizada) através do fígado devido ao grande fluxo sanguíneo hepático [56].

O metabolismo da P4 geralmente envolve a hidroxilação das enzimas CYP-450 (a enzima CYP3A4 é a enzima mais abundante no fígado) ou redução pelo mecanismo 5-alfa redutase [56]. O mecanismo mais comum de metabolismo da P4, com base em pesquisas em ovinos, é pela 6-beta hidroxilação [45] ou 21-hidroxilação [46]. Entretanto, os metabólitos de P4 mais encontrados no sangue, nas fezes e na urina são as pregnanas 5-alfa e 5-beta reduzidas, indicando que o mecanismo de redutase é o maior responsável pelo metabolismo da P4 *in vivo*. A insulina parece ser o maior inibidor da expressão de genes e de proteínas de duas das principais enzimas P-450, a CYP3A e CYP2C no fígado de ovinos e de bovinos [37,62]. Isto sugere que futuras pesquisas para reduzir o metabolismo de P4 utilizem como foco o aumento da insulina circulante.

Embora os mecanismos através dos quais ocorre o metabolismo da P4 não estejam bem esclarecidos, o entendimento geral neste momento é o de que a principal razão para a ocorrência de alto metabolismo hepático de P4 em vacas de alta produção em lactação é o alto consumo alimentar que gera um elevado fluxo de sangue gastrointestinal. No entanto, é importante enfatizar que estas ideias e este modelo ainda devem ser considerados hipotéticos até que avaliações definitivas sejam testadas e que o modelo seja completamente comprovado.

#### IV. IMPORTÂNCIA DA ALTA P4 ANTES DA IA

O crescimento folicular sob alta concentração circulante de P4 parece promover efeito benéfico sobre os ovócitos em desenvolvimento e, por conseguinte, sobre o desenvolvimento embrionário, promovendo impacto positivo nos índices de fertilidade, como mensurado por ultrassonografia tanto no diagnóstico de gestação por volta de 30 dias, quanto na diminuição da perda gestacional por volta de 60 dias. Estudos recentes têm demonstrado que a utilização de dispositivos intravaginais de liberação de P4 durante o protocolo Ovsynch aumenta os índices de gestação em 5 a 7% [12,68]. É claro que estes aumentos podem estar re-

lacionados a outros fatores que incluem uma melhor sincronização das vacas inseridas nos protocolos. Para minimizar estes fatores e avaliar de forma mais clara o incremento da fertilidade por meio da suplementação com P4 durante o período de desenvolvimento folicular, nosso grupo avaliou dois programas de sincronização da ovulação em 564 vacas para IATF induzindo aleatoriamente situações de baixa e alta concentração plasmática de P4 antes da IATF. O grupo de baixa P4 apresentou 37,1% na taxa de concepção, enquanto o de alta P4 alcançou 51,0% ( $P < 0,001$ ) [15]. Estes resultados demonstram claramente a importância de se proporcionar altas concentrações séricas de P4 no período que antecede a inseminação, enquanto o folículo dominante se desenvolve, conforme discutido por Inskeep [32], que afirma a relação direta entre fertilidade e níveis de P4 antes da IATF.

Outra observação interessante quando se comparou os grupos de alta vs. baixa P4 [15], foram os índices de perda gestacional avaliados por ultrassonografia entre 28 e 60 dias pós IATF. No grupo com baixa P4, a perda gestacional foi de 14,3% e no grupo de alta P4 foi de apenas 6,8% de perda. É importante enfatizar que, para garantir que a influência da alta P4 sobre o menor índice de perda foi relacionado ao período em que os ovócitos foram expostos à P4 previamente à IATF, foram mensuradas as concentrações de P4 imediatamente após a inseminação e não houve diferença entre estes índices [15].

Outros estudos também identificaram os efeitos positivos da alta P4 durante o desenvolvimento do folículo dominante antes da IATF. Bisinotto *et al.* [3] mensuraram a P4 de um grupo de vacas no dia do primeiro GnRH do protocolo Ovsynch e 7 dias antes deste primeiro GnRH. As vacas foram então classificadas em três grupos, o primeiro incluindo as vacas anovulares, o segundo com vacas iniciando o Ovsynch com baixa P4 e o terceiro com vacas de alta P4. Vacas com alta P4 no início do protocolo apresentaram índices mais altos de prenhez por IA (P/IA, 43,0%), do que vacas com baixa P4 (31,3%) ou vacas anovulares (29,7%) no início do Ovsynch. Em outro experimento [3], o Ovsynch foi iniciado 3 ou 10 dias após uma pré-sincronização com duas injeções de PGF2 $\alpha$  com intervalo de 14 dias. Este delineamento experimental proporcionou novamente situações opostas de níveis de P4 no início do Ovsynch, induzindo a ovulação de um folículo de primeira onda (baixa P4) ou de segunda



onda (alta P4). Os resultados foram similares aos do experimento anterior, tendo as vacas com baixa P4 apresentado P/IA inferiores em relação às de alta P4 (30,4% vs. 41,7%, respectivamente). Desta forma, fica evidente a influência positiva da alta P4 durante o crescimento folicular proporcionando aumento médio de 10% na fertilidade de vacas leiteiras de alta produção. Entretanto, as razões para se alcançar estes índices não estão ainda bem elucidadas.

Denicol *et al.* [17] delinearum um experimento criando um grupo de baixa P4, com a indução da ovulação de folículo da primeira onda folicular, comparado a outros dois grupos com alta P4, um deles induzindo a ovulação de folículo da segunda onda e o outro com indução de ovulação de folículo da primeira onda, mas com a suplementação de dois dispositivos de P4 para compensar este déficit. Os índices de P/IA foram superiores ( $P < 0,01$ ) nos grupos de alta P4, tanto no grupo de ovulação de segunda onda (43,9%), quanto no grupo de primeira onda suplementado por P4 exógena (36,4%) em relação ao grupo de baixa P4, com a ovulação de folículo da primeira onda (24,3%), confirmando a importância de se proporcionar alta P4 durante o desenvolvimento do folículo dominante.

Vacas submetidas a programas de superovulação para colheita de embriões produzidos *in vivo* também foram avaliadas quanto aos níveis de P4 durante o desenvolvimento dos folículos superestimulados [53]. Em delineamento similar ao descrito no parágrafo anterior e realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, um grupo de vacas teve a superestimulação iniciada durante a primeira onda folicular (baixa P4), outro grupo durante a segunda onda folicular (alta P4) e um terceiro grupo novamente durante a primeira onda, mas neste as vacas receberam dois dispositivos intravaginais de liberação de P4, para compensar o momento de início com baixa P4. Embora o número de estruturas (ovócitos e embriões) recuperadas não tenha sido diferente entre os três grupos, o índice de embriões de melhor qualidade, e considerados transferíveis, no grupo de primeira onda com baixa P4 (55,9%) foi inferior em relação ao grupo de segunda onda com alta P4 endógena (88,5%) e em relação ao grupo de primeira onda com suplementação de P4 exógena (78,6%). Em vacas de corte, a suplementação de P4 em vacas superestimuladas durante a primeira onda com suplementação de P4 também apresentou índice mais alto de embriões de melhor qualidade em relação às não suplementadas

[48]. Estes dados parecem concordar com a hipótese de que é importante induzir condição de alta P4 durante o desenvolvimento folicular para a melhor qualidade dos ovócitos e embriões.

Porém, outros dois estudos recentes não demonstraram diferença na qualidade de embriões colhidos sem superestimulação. No primeiro deles [10], embriões colhidos no dia 7 pós-inseminação não diferiram em qualidade sob baixa P4 (53,3%) ou sob alta P4 (58,3%). Um estudo complementar do mesmo grupo [10] indicou que a baixa P4 aumentou os níveis basais do hormônio luteinizante (LH), alterando a dinâmica folicular e a composição do fluido folicular, o que pode ter alterado a qualidade ovocitária e principalmente pode ter desenvolvido um mecanismo precoce de liberação de PGF2 $\alpha$ . Em consequência, a função uterina foi alterada e pode ter levado a uma redução na fertilidade das vacas com baixa concentração de P4 no período anterior à inseminação.

Por outro lado, nosso laboratório [80] recentemente concluiu um estudo em que vacas sem superestimulação foram submetidas à lavagem uterina para recuperação embrionária no dia 7 pós-IATF, também em condições induzidas de baixa P4 vs. alta P4. Observamos um índice mais alto de embriões de graus 1 e 2 nas vacas com alta P4 (86,2%) do que nas vacas com baixa P4 (61,5%;  $P = 0,02$ ). Estes resultados são consistentes com aqueles observados por Rivera *et al.* [53] em vacas superovuladas.

Entretanto, quando se compara dois métodos de pré-sincronização que proporcionem alta P4 durante o desenvolvimento folicular, as diferenças tendem a diminuir, ou mesmo a não ocorrerem. Herlihy *et al.* [27] avaliando dois grupos supostamente de alta P4, sendo um deles submetido à pré-sincronização com duas PGF2 $\alpha$  (PS, [43]) seguida do Ovsynch, comparado ao protocolo Duplo-Ovsynch (DO, [64]). Herlihy *et al.* [27] observaram maior número de vacas com baixa P4 ( $< 0,50$  ng/mL) no grupo sincronizado com o PS (25,3%) do que com o DO (5,4%). Consequentemente, os índices de P/IA em primíparas foi superior ( $P = 0,02$ ) no DO (52,5%) em relação ao PS (42,3%) e houve uma tendência ( $P = 0,07$ ) nas múltiparas favorável ao DO (40,3%) em relação ao PS (34,3%). Entretanto, neste caso, apenas uma categoria foi beneficiada porque ambos os grupos foram suplementados por alta P4 antes da IATF. Da mesma forma, Stevenson *et al.* [71] também pré-sincronizaram um grupo de vacas com

duas injeções de PGF2 $\alpha$  10 dias antes do Ovsynch (Presynch-10) ou utilizaram uma injeção de PGF2 $\alpha$  10 dias antes, somada a uma de GnRH 7 dias antes do Ovsynch (P-3-G), proporcionando mais uma vez alta P4 para ambos os grupos. Também nesta situação não houve diferença nos índices de P/IA entre os grupos P-3-G (40,0%) vs. Presynch-10 (33,3%), indicando uma vez mais que nos casos em que se proporciona alta P4 para ambos os grupos antes da IA, a possibilidade de alteração nos índices de fertilidade é menor ou inexistente.

Neste momento não é possível dar uma explicação definitiva acerca das razões pelas quais a fertilidade de vacas de alta produção é influenciada de maneira tão significativa pelos altos níveis de P4 plasmático. Os mecanismos que atuam no incremento da fertilidade desta categoria animal precisam ser mais bem compreendidos para que os programas de manejo reprodutivo também se tornem mais eficientes.

#### V. IMPORTÂNCIA DA BAIXA P4 PRÓXIMO DO MOMENTO DA IA

Além de um adequado ambiente de alta P4 antes da IA ou durante o crescimento folicular, a redução eficiente da P4 circulante conforme se aproxima o momento da ovulação e da fecundação parece ser um fator determinante para fertilização [63] e concepção. Os baixos níveis de P4 próximo ao momento da IA são promovidos pela ocorrência de uma adequada luteólise. Caso isso não ocorra de forma eficiente, pode haver um comprometimento dos índices de fertilidade. Este problema pode ser observado tanto em programas de sincronização de ovulação para IATF [5,63] quanto em programas de inseminação baseado na observação de estro [18,23,75]. Vários estudos demonstraram que mesmo um pequeno aumento nas concentrações de P4 de vacas observadas em estro, são inversamente proporcionais aos índices de concepção [18,23,75]. De Silva *et al.* [18] estudaram o aumento da P4 em novilhas (n = 76) e em vacas (n = 123) observadas duas vezes ao dia para detecção de estro seguida de inseminação e observaram uma relação inversa entre níveis plasmáticos de P4 e fertilidade. Vacas com baixa P4 (0,2 ng/mL em média) próximo do momento da IA apresentaram 50% de P/IA, enquanto vacas com alta P4 (0,8 ng/mL em média) próxima do momento da IA apresentaram somente 20% de P/IA. Waldmann *et al.* [75] avaliando cerca de duas mil vacas de corte em 458 rebanhos também observaram uma clara relação

inversa entre a alta P4 próxima da IA e a fertilidade mensurada por taxa de não retorno à ciclicidade. Um estudo realizado por Ghanem *et al.* [23] mais uma vez observaram grande diferença na taxa de P/IA quando houve aumento da P4 próximo do momento da IA, bem como índice de perda gestacional mais alto. Nestes estudos não é possível identificar se o problema está na falta de acurácia na observação de estro, com consequente aumento da proporção de vacas recebendo IA no período do diestro, ou se o fator limitante na concepção foi relacionado com a incompleta luteólise e concomitantes sinais de estro em presença de P4, ainda que pouco elevada. Estas duas principais razões podem induzir inseminadores ao erro e a realização da IA em vacas sob elevada concentração de P4.

Os problemas que propiciam elevadas concentrações de P4, ou P4 não suficientemente reduzidas, no período próximo a IA vêm sendo amplamente estudados nos últimos anos. Estes estudos demonstram que a incidência de vacas com luteólise incompleta variam de 5% a 30% [6,24,40,42,63]. Um estudo recente utilizando vacas submetidas ao primeiro serviço (n = 652) e vacas ao segundo ou mais serviços (n = 394) comparou a luteólise em ambas as categorias e utilizou como parâmetro de regressão luteal completa os animais com baixa P4 (<0,5 ng/mL) às 56, 72 e 96 h pós IA. As vacas de primeiro serviço apresentaram 79% de luteólise completa e as de segundo ou mais serviços tiveram 71% de regressão luteal completa (P = 0,03), o que poderia sugerir a diminuição da fertilidade em vacas repetidoras de serviço devido à incompleta regressão luteal. Outra constatação surpreendente foi a de que vacas com a P4 mais alta apresentaram maior probabilidade de sofrerem luteólise e em consequência apresentarem fertilidade mais alta (50% vs. 28% para vacas com alta vs. baixa P4 no momento da PGF2 $\alpha$ , respectivamente).

Há duas principais razões que poderiam explicar os mecanismos fisiológicos que resultam na queda da fertilidade quando a P4 é alta próxima da IA. A primeira é que a P4 pode modificar o padrão fisiológico do transporte dos gametas por meio de alterações na contratilidade do útero ou do oviduto e então reduzindo a taxa de fecundação [30]. A segunda possível explicação é que a P4 pode ocasionar efeitos negativos diretos sobre o desenvolvimento embrionário, quando foi adicionada P4 ao meio de cultivo reduzindo a taxa de blastocistos [60].

Para comprovar esta ação da P4, foi observado efeito inverso ao se utilizar um antagonista de receptor de P4 (RU486), que neutralizou a ação prejudicial da P4 sobre o meio de cultivo. A elevação da P4 também induziu o aumento da  $\alpha$ -inibina produzida pelo complexo cumulus ovócito, que pode reduzir o desenvolvimento embrionário após a clivagem [61]. Recentemente, também foi detectado que os níveis de progesterona circulante antes e no momento da IA podem influenciar espessura da parede uterina [65], sugerindo outros efeitos importantes da P4 sobre o útero e que poderiam limitar indiretamente o desenvolvimento embrionário.

Uma alternativa que vem sendo constantemente estudada e já utilizada por alguns rebanhos leiteiros nos EUA e em outros países é a administração de duas injeções de PGF2 $\alpha$  ao final do protocolo de sincronização da ovulação para garantir uma adequada luteólise e, conseqüentemente, aumentar os índices de fertilidade. Ribeiro *et al.* [52] comparando diferentes tipos de protocolos de sincronização e de tratamentos luteolíticos, observaram que o grupo que recebeu duas doses de PGF2 $\alpha$  apresentou índices de luteólise superiores ( $P < 0,01$ ) em relação ao que recebeu apenas uma dose de PGF2 $\alpha$ , 95,9% e 72,2%, respectivamente. Essa diferença foi ainda maior no grupo de vacas submetidas a uma pré-sincronização (96,2% com duas PGF2 $\alpha$  vs. 61,7% com uma PGF2 $\alpha$ ). Portanto, o uso de dupla dose de PGF parece estar relacionada a melhores índices de luteólise e fertilidade principalmente em protocolos de sincronização de ovulação modernos que utilizam menores intervalos entre indução de ovulação e regressão do CL.

Em suma, a alta P4 próxima da IA tem sido amplamente documentada como fator prejudicial aos índices de fertilidade. Entretanto, os mecanismos fisiológicos por trás destes eventos ainda não estão elucidados e neste momento não podem ser mais bem explicados. Alternativas para minimizar os problemas relacionados à luteólise incompleta contemplam a utilização de duas doses de PGF2 $\alpha$  ao final dos protocolos de sincronização da ovulação [6], além de métodos mais acurados de detecção de estro.

## VI. IMPORTÂNCIA DA ALTA P4 APÓS A IA

Em situações ideais de alta concentração circulante de P4 durante o desenvolvimento folicular e

adequada luteólise com níveis basais de P4 próximo do momento da IA, a suplementação de P4 após a IA parece ser benéfica e relacionada ao adequado crescimento embrionário e a conseqüente produção de interferon-tau para o reconhecimento materno da gestação. Apesar das evidências inquestionáveis da importância da P4 para a manutenção da gestação [32], os resultados de experimentos com suplementação de P4 após a inseminação são controversos quando se tenta correlacionar o aumento da P4 após a IA com os índices de fertilidade a campo. Isto porque alguns trabalhos relatam níveis de P4 mais altos em vacas vazias do que em vacas prenhes, enquanto outros não conseguiram correlacionar concentrações de P4 pós IA e fertilidade [7,24,34,38,39,44,73]. Utilizando modelos mais acurados como a regressão logística para associar níveis de P4 com a fertilidade, foi demonstrada uma relação entre concentrações circulantes de P4 nos dias 5, 6 e 7 após a IA com proporção de vacas gestantes [73]. Estes autores, com base nos níveis absolutos de P4 durante a fase luteal inicial ou sobre a taxa de aumento da P4, reportaram que 60 a 85% das vacas leiteiras apresentam concentrações circulantes subótimas de P4 para a manutenção da gestação.

Embriões em estágio inicial de desenvolvimento expressam diferentes tipos e concentrações de receptores de P4 [14], levantando a possibilidade de que a P4 poderia atuar diretamente sobre o embrião e afetar seu desenvolvimento [14]. Entretanto, não houve influência direta da P4 sobre o desenvolvimento embrionário precoce *in vitro*, mais especificamente sobre a taxa de produção de blastocistos, na presença ou ausência de células epiteliais de oviduto de bovinos [14]. Assim, parece que o desenvolvimento de blastocistos não é diretamente alterado pela suplementação com P4. Evidência disto também foi observada em receptoras tratadas com dispositivo intravaginal de P4 a partir do dia 3 até o dia 6 pós-ovulação [14]. Assim, no dia 7, estas receptoras receberam embriões produzidos *in vitro*, ou seja, os embriões não tiveram contato direto com a suplementação de P4. Mesmo assim, observou-se que os embriões transferidos nas receptoras que receberam o tratamento prévio com P4 eram mais longos no dia 14 do que aqueles transferidos em receptoras não suplementadas. Aparentemente, a P4 induziu modificações uterinas que proporcionaram

maior desenvolvimento aos embriões, porque eles não precisaram de um contato direto com a P4 para se tornarem mais desenvolvidos do que os embriões das vacas não tratadas [14]. Estes resultados são consistentes com os observados por Larson *et al.* [36] que não observaram efeito direto da P4 sobre os embriões, que se desenvolveram do estágio de mórula a blastocisto entre os dias 1 a 3 ou 4 a 7 de cultivo. Carter *et al.* [8,9] também não observaram evidência de efeito direto da P4 sobre o desenvolvimento inicial dos embriões. Para isso, 210 novilhas cruzadas foram usadas para analisar o efeito da suplementação com P4 sobre o desenvolvimento embrionário. Não foram observadas diferenças sobre o desenvolvimento dos embriões entre os dias 5 ou 7 após a IA, entretanto, um efeito importante na alongação dos embriões resultante da suplementação com P4 foi observado nos dias 13 e 16 após a IA [8]. Em estudo posterior, Carter *et al.* [9] transferiu embriões produzidos *in vitro* em ovidutos de novilhas de corte suplementadas ou não no dia 3 após o estro. Não houve diferença na taxa de blastocistos que se desenvolveram até o dia 7, quando os embriões foram colhidos ou durante o desenvolvimento subsequente quando os embriões continuaram sob cultivo *in vitro*. Porém, foram detectadas diferenças significativas na expressão gênica através de micro arranjo nos embriões recuperados das receptoras suplementadas com P4. Desta forma, parece claro que o aumento da P4 durante os dias 3 a 7 induz modificações uterinas que irão proporcionar a alongação do embrião, passível de ser mensurada no dia 14. Se a suplementação com P4 aumenta o desenvolvimento embrionário e se este é proporcional aos índices de fertilidade é uma pergunta que permanece sem resposta até este momento e merece mais investigação.

Também parece claro que há diferenças importantes na expressão gênica do útero conforme a fase luteal progride ao longo do ciclo estral e a suplementação precoce com P4 parece antecipar a expressão destas modificações induzidas pela P4 [21,41]. As alterações induzidas pela P4 apresentam consequências drásticas para o desenvolvimento embrionário [21].

Estudos envolvendo a suplementação de P4 pós-inseminação datam da década 1950, quando os primeiros estudos foram realizados [28,78]. Desde

então, numerosos experimentos vêm sendo realizados com P4 exógena (P4 injetável, dispositivos de liberação de P4) ou P4 endógena (hCG ou GnRH para indução de ovulação de um folículo para a produção de CL acessório). Muitos destes experimentos foram revisados por Mann e Lamming [39] e apresentaram uma variação considerável, com diferentes tipos de animais (de corte ou leiteiro; novilhas ou vacas), dia da suplementação ou administração relativa a IA, uso de sincronização antes da IA e número de animais nos experimentos (n). Para a presente seção, utilizamos 30 experimentos, sendo que a maior parte (25 experimentos) relatou diferença numérica favorável ao uso de suplementação com P4, embora apenas seis tenham apresentado diferença estatística ( $P < 0,05$ ). Destes seis experimentos, somente dois [2,69] usaram mais de 100 vacas por grupo nas comparações. Nos experimentos com mais vacas geralmente foram observados menos efeitos significativos do que nos experimentos com menos vacas (Tabela 1).

A variação existente entre os 30 experimentos citados levaram nosso grupo a procurar um perfil de P4 para servir de parâmetro para a comparação de diferentes tipos de suplementação de P4 para vacas de alta produção em lactação. Para isto, Nascimento *et al.* [47] utilizaram o perfil de P4 de novilhas HPB de alta fertilidade como parâmetro para compará-las com vacas em lactação suplementadas com P4 proveniente de fonte exógena, endógena ou ambas associadas. Até o momento, não observamos na literatura nenhum trabalho que associou fontes exógenas e endógenas no mesmo tratamento, como executado pelo nosso grupo. Desta forma, vacas em lactação foram suplementadas no dia 5 pós IA com um CIDR (P4 exógena), com 3.300 UI de hCG (P4 endógena), ou com CIDR+hCG, associando ambas as fontes (P4 exógena e endógena). Apenas o grupo CIDR+hCG atingiu o perfil de P4 observado nas novilhas do dia 6 ao dia 15 do ciclo estral, sugerindo que a suplementação utilizada na maior parte dos trabalhos na literatura seja inadequada ou não tenha atingido níveis necessários de suplementação de P4 para vacas lactantes e com alto metabolismo de hormônios esteroides.



**Tabela 1.** Efeito da suplementação com P4 sobre a fertilidade de vacas leiteiras.

Ref	Fonte P4	Dia Trat	Tipo	Sinc	Controle (%)	Tratamento (%)	Difer (%)	P
INJETÁVEL								
[27]		D 0	VL		5 (1/20)	35 (7/20)	+30	0,017
[15]		D 4-5	VL		16,7 (3/18)	46,8 (22/47)	+30,1	0,025
[77]	Subcutânea	D 3	VL	Não	29,9 (20/67)	41,8 (28/67)	+11,9	0,149
PRID/CIDR								
[53]	PRID	D 5 - 12	HPB L	Não	30 (9/30)	60,7 (17/28)	+30,7	0,018
[73]	PRID	D 5 - 19	HPB L	Não	33,8 (50/148)	36,3 (52/143)	+2,5	0,644
[24]	CIDR	D4,5,12	HPB L	Sim	35 (143/408)	36,7 (145/395)	+1,7	0,41
[34]	CIDR	D 3 - 10	HPB L	Sim	35 (22/63)	48 (32/67)	+13	0,37
[30]	CIDR	D 5 - 12	HPB L	Não	38,3 (141/368)	36,6 (144/393)	-1,7	0,633
hCG/GnRH								
[65]	1500 IU hCG	D 5	VL		45 (9/20)	73,7 (14/19)	+18,7	0,068
[3]	3000 IU hCG	D 4	NC	Sim	55 (6/11)	92 (11/12)	+37	0,042
[57]	3000 IU hCG	D 5	HPB L	Sim	23,5 (23/98)	24,2 (25/103)	+0,7	0,893
[56]	3300 IU hCG	D 5	HPB L	Sim	38,7 (79/203)	45,8 (93/203)	+7,1	0,159
[76]	100 µg GnRH	D 5	HPB L	Sim	19 (7/37)	32 (11/34)	+13	0,248
[19]	2500 IU hCG	D 4	HPB L		36,5 (156/427)	37,1 (160/431)	+0,6	0,858
[21]	3333 IU hCG	D 5 - 6	NC	Sim	59,6 (230/386)	62,6 (242/386)	+3	0,375
[24]	1500 IU hCG	D 5	HPB L	Sim	46,3 (82/177)	43,6 (78/179)	-2,7	0,601
[28]	100 µg GnRH	D 5	VL	Sim	26,7 (71/266)	24,3 (67/276)	+2,4	0,518
[58]	3000 IU hCG	D 5	VL	Não	35,2 (31/88)	27,5(19/70)	-7,7	0,277
[30]	1500 IU hCG	D 5	HPB L	Não	41,3 (118/286)	45,2 (123/272)	+3,9	0,344
[2]	2000 IU hCG 3300 IU hCG	D 5	HPB L	Sim	37,3 (566/1519)	40,8 (596/1460)	+3,5	0,01
Combinação								
[1]	100 µg GnRH 1500 IU hCG	D 5 D 5	HPB L HPB L	Não Não	10,1 (3/26) ---	36,8 (9/27) 32,8 (7/21)	+26,7 +22,7	0,058 0,069
[69]	CIDR (7 d)	D 4-9	HPB L	Não	28,3 (200/708)	32,7 (232/711)	+4,4	0,075
	3300 IU hCG	D 4 - 9	HPB L	Não	---	33,6 (240/714)	+5,3	<,05
	100 µg GnRH	D 4 - 9	HPB L	Não	---	28,1 (202/719)	-0,2	NS
[66]	100 µg GnRH	D 5	HPB L	Sim	45,8 (174/380)	49,1 (188/383)	+3,3	0,361
	CIDR	D 5 - 12	HPB L	Sim	---	46,8 (102/218)	+1,0	0,20
[75]	PRID	D 5 - 12	HPB L	Não	57,1 (8/14)	61,5 (8/13)	+4,4	NS
	Inj (200 mg/d)	5,7,9,11	HPB L	Não	---	75,0 (9/12)	+17,9	NS
	1500 IU hCG	D 5	HPB L	Não	---	57,1 (8/14)	0,0	NS

HPB L=Holandês preto e branco lactante; VL=Vaca leiteira; NC=Novilha de corte. Sinc = foi utilizada sincronização?

## VII. CONCLUSÕES

Esta revisão teve como objetivos descrever a fisiologia da produção e do metabolismo de P4 provocado por modificações na circulação de P4 em vacas leiteiras de alta produção e os potenciais desafios reprodutivos associados às concentrações subótimas de P4. O metabolismo da P4 parece ser a principal causa da baixa concentração de P4 em vacas de alta produção leiteira, embora as modificações na produção de P4 nesta categoria animal não tenham sido excluídas com base em experimentação científica.

Procurou-se revisar a relação entre níveis de P4 e de fertilidade com evidências claras do efeito da P4 nos três períodos analisados. Antes da IA, quando efeitos drásticos de mais de 10% em P/IA foram observados após a suplementação com P4. A vaca em lactação parece ter concentrações insuficientes de P4 durante este período e isto pode levar, ao menos em parte, a uma alta taxa de dupla ovulação e de baixa fertilidade, característicos de vacas de alta produção leiteira. Próximo do momento da IA, é essencial que as concentrações de P4 atinjam níveis basais. Mesmo pequenos aumentos de P4 próximo do momento da

IA foram associados com reduções drásticas de fertilidade, tanto em vacas inseminadas após observação de estro quanto em programas de IATF. Após a IA, a importância da P4 elevada é reconhecida pela necessidade de alongação do embrião e rápido reconhecimento materno da gestação. Entretanto, estes efeitos essenciais para incrementar os índices de P/IA não têm sido constatados em experimentos de campo que visam suplementar com P4 as vacas de alta produção. Desta forma, embora muito se tenha feito no intuito de desvendar os mecanismos fisiológicos que regem o desbalanço que há no provimento de P4 em diferentes momentos, bem como alternativas para compensá-lo, mais pesquisas precisam ser realizadas para incrementar os índices de fertilidade de vacas leiteiras de alta produção.

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

**Acknowledgements.** Agradecemos à FAPESP pela concessão de bolsa de pós-doutorado para Anibal Ballarotti do Nascimento, processo no. 2011/07243-0.

## REFERÊNCIAS

- 1 **Beltran M.P. & Vasconcelos J.L.M. 2008.** Conception rate in Holstein cows treated with GnRH or hCG on the fifth day post artificial insemination during summer. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 60(3): 580-586.
- 2 **Bender R.W., Nascimento A.B., Souza A.H., Ayres H., Araújo R.R., Guenther J.N. & Wiltbank M.C. 2011.** Effect of treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) on day 5 after timed artificial insemination (TAI) on fertility in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 94(E-Suppl.1): 62.
- 3 **Bisinotto R.S., Chebel R.C. & Santos J.E.P. 2010.** Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93(8): 3578-3587.
- 4 **Breuel K.F., Spitzer J.C. & Henricks D.M. 1989.** Systemic progesterone concentration following human chorionic-gonadotropin administration at various times during the estrous-cycle in beef heifers. *Journal of Animal Science*. 67(6): 1564-1572.
- 5 **Brusveen D.J., Cunha A.P., Silva C.D., Cunha P.M., Sterry R.A., Silva E.P., Guenther J.N. & Wiltbank M.C. 2008.** Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and artificial insemination (AI) during Ovsynch affects pregnancies per AI in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 91(3): 1044-1052.
- 6 **Brusveen D.J., Souza A.H. & Wiltbank M.C. 2009.** Effects of additional prostaglandin F-2 alpha and estradiol-17 beta during Ovsynch in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 92(4): 1412-1422.
- 7 **Bulman D.C. & Lamming G.E. 1978.** Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 54(2): 447-458.
- 8 **Carter F., Forde N., Duffy P., Wade M., Fair T., Crowe M.A., Evans A.C.O., Kenny D.A., Roche J.F. & Lonergan P. 2008.** Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reproduction, Fertility and Development*. 20(3): 368-375.

- 9 **Carter F., Rings F., Mamo S., Holker M., Kuzmany A., Besenfelder U., Havlicek, V., Mehta J.P., Tesfaye D., Schellander K. & Lonergan P. 2010.** Effect of elevated circulating progesterone concentration on bovine blastocyst development and global transcriptome following endoscopic transfer of in vitro produced embryos to the bovine oviduct. *Biology of Reproduction.* 83(5): 707-719.
- 10 **Cerri R.L.A., Chebel R.C., Rivera F., Narciso C.D., Oliveira R.A., Thatcher W.W. & Santos J.E.P. 2011.** Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: I. Ovarian and embryonic responses. *Journal of Dairy Science.* 94(7): 3342-3351
- 11 **Cerri R.L.A., Chebel R.C., Rivera F., Narciso C.D., Oliveira R.A., Amstalden M., Baez-Sandoval G.M., Oliveira L.J., Thatcher W.W. & Santos J.E.P. 2011.** Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. *Journal of Dairy Science.* 94(7): 3352-3365.
- 12 **Chebel R.C., Al-Hassan M.J., Fricke P.M., Santos J.E.P., Lima J.R., Martel C.A., Stevenson J.S., Garcia R. & Ax R.L. 2010.** Supplementation of progesterone via controlled internal drug release inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 93(3): 922-931.
- 13 **Christenson R.K., Ford J.J. & Redmer DA. 1985.** Metabolic-clearance and production-rates of estradiol and progesterone during pubertal and postpubertal development in gilts. *Journal of Reproduction and Fertility.* 75(1): 247-253.
- 14 **Clemente M., de la Fuente J., Fair T., Al Naib A., Gutierrez-Adan A., Roche J.F., Rizos D. & Lonergan P. 2009.** Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction.* 138(3): 507-517.
- 15 **Cunha A.P., Guenther J.N., Maroney M.J., Giordano J.O., Nascimento A.B., Bas S., Ayres H. & Wiltbank M.C. 2008.** Effects of high vs. low progesterone concentrations during Ovsynch on double ovulation rate and pregnancies per AI in high producing dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 91(Suppl. 1): 246.
- 16 **Dawson F.L.M. 1954.** Progesterone in functional infertility of cattle. *Veterinary Records.* 66: 324-326.
- 17 **Denicol A.C., Lopes Jr. G., Mendonça L.G.D., Rivera F.A., Guagnini F., Perez R.V., Lima J.R., Bruno R.G.S., Santos J.E.P. & Chebel R.C. 2012.** Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science.* 95(4): 1794-1806.
- 18 **De Silva A.W.M.V., Anderson G.W., Gwazdauskas F.C., McGilliard M.L. & Lineweaver J.A. 1981.** Interrelationships with estrous behavior and conception in dairy cattle. *Journal of Dairy Science.* 64(12): 2409-2418.
- 19 **Diaz F.J., Anderson L.E., Wu Y.L., Rabot A., Tsai S.J. & Wiltbank M.C. 2002.** Regulation of progesterone and prostaglandin F<sub>2</sub>alpha production in the CL. *Molecular Cellular Endocrinology.* 191(1): 65-80.
- 20 **Fischer-Tenhagen C., Thiele G., Heuwieser W. & Tenhagen B.A. 2010.** Efficacy of a Treatment with hCG 4 days After AI to Reduce Pregnancy Losses in Lactating Dairy Cows After Synchronized Ovulation. *Reproduction in Domestic Animals.* 45(3): 468-472.
- 21 **Forde N., Beltman M.E., Duffy G.B., Duffy P., Mehta J.P., O'Gaora P., Roche J.F., Lonergan P. & Crowe M.A. 2011.** Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biology of Reproduction.* 84(2): 266-278.
- 22 **Funston R.N., Lipsey R.J., Geary T.W. & Roberts A.J. 2005.** Effect of administration of human chorionic gonadotropin after artificial insemination on concentrations of progesterone and conception rates in beef heifers. *Journal of Animal Science.* 83(6): 1403-1405.
- 23 **Ghanem M.E., Nakao T., Nakatani K., Akita M. & Suzuki T. 2006.** Milk progesterone profile at and after artificial insemination in repeatbreeding cows: effects on conception rate and embryonic death. *Reproduction in Domestic Animals.* 41(2): 180-183.
- 24 **Gumen A., Guenther J.N. & Wiltbank M.C. 2003.** Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 86(10): 3184-3194.
- 25 **Hanlon D.W., Davidson P.J., Hittmann A.R. & Joe A.K. 2005.** Supplementing previously treated anestrous dairy cows with progesterone does not increase first-service conception rate. *Theriogenology.* 63(1): 239-245.
- 26 **Hanlon D.W., Jarratt G.M., Davidson J.P.J., Millar A.J. & Douglas V.L. 2005.** The effect of hCG administration five days after insemination on the first service conception rate of anestrous dairy cows. *Theriogenology.* 63(7): 1938-1945.
- 27 **Herlihy M.M., Giordano J.O., Souza A.H., Ayres H., Ferreira R.M., Keskin A., Nascimento A.B., Guenther J.N., Gaska J.M., Kacuba S.J., Crowe M.A., Butler S.T. & Wiltbank M.C. 2012.** Presynchronization with Double-Ovsynch improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 95(12): 7003-7014.

- 28 **Herrick J.B. 1953.** Clinical observation of progesterone therapy in repeat breeding heifers. *Veterinary Medicine*. 48: 489-490.
- 29 **Howard J.M., Manzo R., Dalton J.C., Frago F. & Ahmadzadeh A. 2006.** Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 95(3-4): 224-233.
- 30 **Hunter R.H.F. 2005.** The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reproduction, Nutrition and Development*. 45(3): 281-290.
- 31 **Kendall N.R., Flint A.P.F. & Mann G.E. 2009.** Incidence and treatment of inadequate postovulatory progesterone concentrations in repeat breeder cows. *Veterinary Journal*. 181(2): 158-162.
- 32 **Inskeep E.K. 2004.** Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal of Animal Science*. 82(E-Suppl): E24-39.
- 33 **Janson P.O., Damber J.E. & Axen C. 1981.** Luteal blood flow and progesterone secretion in pseudopregnant rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*. 63(2): 491-497.
- 34 **Larson S.F., Butler W.R. & Currie W.B. 1997.** Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 80(7): 1288-1295.
- 35 **Larson S.F., Butler W.R. & Currie W.B. 2007.** Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 102(1-2): 172-179.
- 36 **Larson J.E., Krisher R.L. & Lamb G.C. 2011.** Effects of supplemental progesterone on the development, metabolism and blastocyst cell number of bovine embryos produced *in vitro*. *Reproductio, Fertility and Development*. 23(2): 311-318.
- 37 **Lemley C.O., Wilmoth T.A., Tager L.R., Krause K.M. & Wilson M.E. 2010.** Effect of a high cornstarch diet on hepatic cytochrome P450 2C and 3A activity and progesterone half-life in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93(3): 1012-1021.
- 38 **Lonergan P., Woods A., Fair T., Carter F., Rizos D., Ward F., Quinn K. & Evans A. 2007.** Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*. 19(7): 861-868.
- 39 **Mann G.E. & Lamming G.E. 1999.** The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. 34(3-4): 269-274.
- 40 **Martins J.P.N., Policelli R.K., Neuder L.M., Raphael W. & Pursley J.R. 2011.** Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F-2 alpha of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 94(6): 2815-2824.
- 41 **McNeill R.E., Sreenan J.M., Diskin M.G., Cairns M.T., Fitzpatrick R., Smith T.J. & Morris D.G. 2006.** Effect of systemic progesterone concentration on the expression of progesterone-responsive genes in the bovine endometrium during the early luteal phase. *Reproduction Fertility and Development*. 18(5): 573-583.
- 42 **Moreira F., de la Sota R.L., Diaz T. & Thatcher W.W. 2000.** Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*. 78(6): 1568-1576.
- 43 **Moreira F., Orlandi C., Risco C.A., Mattos R., Lopes F. & Thatcher W.W. 2001.** Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 84(7): 1646-1659.
- 44 **Morris D. & Diskin M. 2008.** Effect of progesterone on embryo survival. *Animal*. 2(8): 1112-1119.
- 45 **Murray M. 1991.** Microsomal cytochrome-P450-dependent steroid metabolism in male sheep liver - Quantitative importance of 6-beta-hydroxylation and evidence for the involvement of a P450 from the IIA subfamily in the pathway. *Journal of Steroid Biochemistry Mollecular Biology*. 38(5): 611-619.
- 46 **Murray M. 1992.** Participation of the a cytochrome P450 enzyme from the 2C subfamily in progesterone 21-hydroxylation in sheep liver. *Journal of Steroid Biochemistry Mollecular Biology*. 43(6): 591-593.
- 47 **Nascimento A.B., Souza A.H., Guenther J.N., Dalla Costa F.P., Sartori R. & Wiltbank M.C. 2012.** Effects of treatment with human chorionic gonadotrophin or intravaginal progesterone-releasing device after AI on circulating progesterone concentrations in lactating dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development*. [in press].
- 48 **Nasser L.F., Sá Filho M.F., Reis E.L., Rezende C.R., Mapletoft R.J., Bo G.A. & Baruselli P.S. 2011.** Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*. 76(2): 320-327.



- 49 Niswender G.D., Juengel J.L., Silva P.J., Rollyson M.K. & McIntush E.W. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiology Review*. 80(1): 1-29.
- 50 O'Shea J.D., Rodgers R.J. & D'Occhio M.J. 1989. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*. 85(2): 483-487.
- 51 Parr R.A., Davis I.F., Miles M.A. & Squires T.J. 1993. Liver blood-flow and metabolic-clearance rate of progesterone in sheep. *Research Veterinary Science*. 55(3): 311-316.
- 52 Ribeiro E.S., Bisinotto R.S., Favoreto M.G., Martins L.T., Cerri R.L., Silvestre F.T., Greco, L.F., Thatcher W.W. & Santos J.E. 2012. Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F<sub>2</sub>α as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*. 78(2): 273-284.
- 53 Rivera F.A., Mendonça L.G.D., Lopes G., Santos J.E.P., Perez R.V., Amstalden M., Correa-Calderon A. & Chebel R.C. 2011. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction*. 141(3): 333-342.
- 54 Robinson N.A., Leslie K.E. & Walton J.S. 1989. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 72(1): 202-207.
- 55 Sangsritavong S. 2002. Studies of steroid metabolism in dairy cattle. 90f. Madison, WI, USA. (Doutorado em Dairy Science) - PhD Dissertation, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA.
- 56 Sangsritavong S., Combs D.K., Sartori R.F., Armentano L.E. & Wiltbank M.C. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol 17β in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 85(11): 2831-2842.
- 57 Santos J.E.P., Thatcher W.W., Pool L. & Overton M.W. 2001. Effect of human chorionic gonadotropin, on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 79(11): 2881-2894.
- 58 Schmitt E.J.P., Diaz T., Barros C.M., delaSota R.L., Drost M., Fredriksson E.W., Staples C.R., Thorner R. & Thatcher W.W. 1996. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Animal Science*. 74(8): 1074-1083.
- 59 Shams-Esfandabadi N., Shirazi A., Mirshokrai P. & Bonyadian M. 2007. Influence of hCG administration after AI on conception rates and serum progesterone concentration in cattle. *Pakistan Journal of Biology Science*. 10(16): 2709-2713.
- 60 Silva C.C. & Knight P.G. 2000. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Journal of Reproductions and Fertility*. 119(2): 261-269.
- 61 Silva C.C., Groome N.P. & Knight P.G. 1999. Demonstration of a suppressive effect of inhibin alpha-subunit on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 115(2): 381-388.
- 62 Smith D.L., Stinefelt B.M., Blemings K.P. & Wilson M.E. 2006. Diet-induced alterations in progesterone clearance appear to be mediated by insulin signaling in hepatocytes. *Journal of Animal Science*. 84(5): 1102-1109.
- 63 Souza A.H., Gumen A., Silva E.P.B., Cunha A.P., Guenther J.N., Peto C.M., Caraviello D.Z. & Wiltbank M.C. 2007. Supplementation with estradiol-17β before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 90(10): 4623-4634.
- 64 Souza A.H., Ayres H., Ferreira R.M., Wiltbank M.C. 2008. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 70(2): 208-215.
- 65 Souza A.H., Silva E.P.B., Cunha A.P., Gumen A., Ayres H., Brusveen D.J., Guenther J. N. & Wiltbank M.C. 2011. Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology*. 75(4): 722-733.
- 66 Sreenan J.M. & Diskin M.G. 1983. Early embryonic mortality in the cow - its relationship with progesterone concentration. *Veterinary Records*. 112(22): 517-521.
- 67 Sterry R.A., Welle M.L. & Fricke P.M. 2006. Treatment with gonadotropin-releasing hormone after first timed artificial insemination improves fertility in noncycling lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 89(11): 4237-4245.
- 68 Stevenson J.S., Pursley J.R., Garverick H.A., Fricke P.M., Kesler D.J., Ottobre J.S. & Wiltbank M.C. 2006. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *Journal of Dairy Science*. 89(7): 2567-2578.

- 69 **Stevenson J.S., Portaluppi M.A., Tenhouse D.E., Lloyd A., Eborn D.R., Kacuba S. & DeJarnette J.M. 2007.** Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. *Journal of Dairy Science*. 90(1):331-340.
- 70 **Stevenson J.S., Tenhouse D.E., Krisher R.L., Lamb G.C., Larson J.E., Dahlen C.R., Pursley J.R., Bello N.M., Fricke P.M., Wiltbank M.C., Brusveen D.J., Burkhart M., Youngquist R.S. & Garverick H.A. 2008.** Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. *Journal of Dairy Science*. 91(7): 2901-2915.
- 71 **Stevenson J.S. & Pulley S.L. 2012.** Pregnancy per artificial insemination after presynchronizing estrous cycles with the Presynch-10 protocol or prostaglandin F(2 $\alpha$ ) injection followed by gonadotropin-releasing hormone before Ovsynch-56 in 4 dairy herds of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 95(11): 6513-6522.
- 72 **Stormshak F., Inskeep E.K., Lynn J.E., Pope A.L. & Casida L.E. 1963.** Progesterone levels in corpora lutea and ovarian effluent blood of the ewe. *Journal of Animal Science*. 22(4): 1021-1026.
- 73 **Stronge A.J. H., Sreenan J.M., Diskin M.G., Mee J.F., Kenny D.A. & Morris D.G. 2005.** Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*. 64(5): 1212-1224.
- 74 **Villarroel A., Martino A., BonDurant R.H., Deletang F. & Sischo W.M. 2004.** Effect of post-insemination supplementation with PRID on pregnancy in repeat-breeder Holstein cows. *Theriogenology*. 61(7-8): 1513-1520.
- 75 **Waldmann A., Reksen O., Landsverk K., Kommisrud E., Dahl E., Refsdal A. & Ropstad E. 2001.** Progesterone concentrations in milk fat at first insemination – effects on non-return and repeat-breeding. *Animal Reproduction Science*. 65(1-2): 33-41.
- 76 **Walton J.S., Halbert G.W., Robinson N.A. & Leslie K.E. 1990.** Effects of progesterone and human chorionic-gonadotropin administration 5 days postinsemination on plasma and milk concentrations of progesterone and pregnancy rates of normal and repeat breeder dairy cows. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*. 54(3): 305-308.
- 77 **Willard S., Gandy S., Bowers S., Graves K., Elias A. & Whisnant C. 2003.** The effects of GnRH administration postinsemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology*. 59(8): 1799-1810.
- 78 **Wiltbank J.N., Hawk H.W., Kidder H.E., Black W.G., Ulberg L.C. & Casida L.E. 1956.** Effect of progesterone therapy on embryos survival in cows of lowered fertility. *Journal of Dairy Science*. 39(4): 456-461.
- 79 **Wiltbank M., Lopez H., Sartori R., Sangsritavong S. & Gumen A. 2006.** Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*. 65(1): 17-29.
- 80 **Wiltbank M.C., Carvalho P.D., Keskin A., Hackbart K.S., Meschiatti M.A., Bastos M.R., Guenther J.N., Nascimento A.B., Herlihy M.M., Amundson M.C. & Souza A.H. 2011.** Effect of progesterone concentration during follicle development on subsequent ovulation, fertilization, and early embryo development in lactating dairy cows. *Biology of Reproduction*. 85: 685.

