



## Programação da receptividade uterina e fertilidade em vacas de corte

*Uterine receptivity and fertility programming in beef cows*

Mario Binelli, Guilherme Pugliesi, Emiliana de Oliveira Santana Batista, Thiago Martins, Everton Lopes, Mariana Sponchiado, Angela Gonella-Diaza, Milena Oliveira, Moana Rodrigues França, Beatriz de Oliveira Cardoso, Bárbara Piffero Mello, Nathalia Souza Gomes, Lais Latorraca, Fabian Cuellar Cuadros

Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Pirassununga-SP, Brasil.

<sup>1</sup>Correspondência: [binelli@usp.br](mailto:binelli@usp.br)

### Resumo

Em bovinos de corte, ocorre significativa mortalidade embrionária durante as três primeiras semanas de gestação. Durante esse período, o desenvolvimento de zigoto a concepto depende exclusivamente das secreções ovidutais e uterinas. O processo de secreção, bem como a qualidade dessas secreções são programados pela exposição sequencial do trato reprodutivo ao estradiol (E2) durante o proestro/estro e à progesterona (P4) durante o diestro inicial. Estratégias visando a otimização da qualidade dos ambientes ovidutal e uterino para o desenvolvimento embrionário serão discutidas e incluem o gerenciamento do crescimento do folículo pré-ovulatório, a suplementação de E2 no proestro, a suplementação de P4 no diestro inicial e combinações entre elas. Ao final, discute-se a intrigante possibilidade do embrião bovino programar o funcionamento do endométrio já na primeira semana de gestação.

**Palavras-chave:** fertilidade, estradiol, progesterona, útero, concepto.

### Abstract

*In beef cattle, there is significant embryonic mortality during the three initial weeks of pregnancy. During this period, the development from zygote to conceptus depends exclusively on secretions from the oviduct and uterus. The process of secretion as well as the quality of such secretions are programmed by the sequential exposure of the reproductive tract to estradiol (E2), during proestrus and estrus, and to progesterone (P4), during early diestrus. Strategies that aim to optimize the quality of the oviductal and the uterine environments towards embryo development are discussed. Strategies include managing growth of the pre-ovulatory follicle, E2 supplementation at proestrus, P4 supplementation during early diestrus and combinations. Last but not least, we discuss the intriguing possibility of bovine embryo programming endometrial function as early as the first week of gestation.*

**Keywords:** fertility, estradiol, progesterone, uterus, conceptus.

### Introdução

Em sistemas de produção de bezerros de corte, a taxa de mortalidade embrionária que ocorre nas três primeiras semanas de gestação chega a 40-50% e impacta negativamente a rentabilidade da cadeia da carne bovina. Durante esse período, o crescimento do concepto depende exclusivamente de secreções do oviduto e do útero. Por limitação de espaço, no contexto do presente trabalho abordaremos principalmente o ambiente uterino, e apenas superficialmente a contribuição do ambiente ovidutal para o desenvolvimento embrionário inicial. Trabalhamos com a hipótese central que a composição bioquímica das secreções ovidutais e uterinas define a qualidade dos respectivos ambientes ovidutal e uterino e, conseqüentemente, determina a sobrevivência ou morte do embrião. Tais secreções são produto do funcionamento do oviduto e do útero, ou seja, das atividades celulares e moleculares desses órgãos. Tais atividades consistem na síntese, conversão e degradação seletiva e no transporte de moléculas oriundas do sangue e produzidas nos próprios tecidos para seus lúmens, onde o embrião se desenvolverá. A programação do funcionamento ovidutal e uterino é complexa. Há tanto estímulos endócrinos, pelos esteroides sexuais estradiol e progesterona, quanto parácrinos, por fatores produzidos pelos próprios órgãos, como as prostaglandinas, e por fatores produzidos pelo embrião como o interferon-tau. O objetivo do presente trabalho é reportar sobre estratégias para manipular o funcionamento ovidutal e uterino de maneira a favorecer o desenvolvimento embrionário e a fertilidade de vaca de corte. Dividiremos tais estratégias de acordo com o momento de seu emprego, ou seja, antes ou após a ovulação. Ao final, discutiremos a intrigante possibilidade do embrião bovino programar o funcionamento do endométrio já na primeira semana de gestação.

### Estratégias aplicadas antes da ovulação

Durante os estágios que antecedem (proestro/estro) e sucedem (metaestro/diestro inicial) a ovulação em bovinos, importantes mudanças nas concentrações circulantes de hormônios sexuais ocorrem e definem o perfil endócrino periovulatório (PEP). Modificações no PEP compreendem variações nas concentrações pré-ovulatórias de estradiol (E2) e pós-ovulatórias de progesterona (P4). Tais variações estão positivamente associadas com o crescimento do folículo pré-ovulatório (POF) e do corpo lúteo (CL) resultante da sua ovulação (Vasconcelos et al., 2001; Binelli et al., 2014). Desta maneira, POF maiores promovem maiores concentrações circulantes de E2 no proestro/estro e resultam em maiores CLs e concentrações de P4 no diestro em vacas de corte (Peres et al., 2009; Vasconcelos et al., 2001; Mesquita et al., 2014). O PEP afeta a fertilidade, já que fêmeas de corte com maior diâmetro de POF no momento da IATF (>11,0 mm) apresentam maiores taxas de prenhez, considerando-se tanto todas as vacas como apenas as vacas ovuladas (Perry et al., 2005; Perry et al., 2007; Sá Filho et al., 2010b; Pugliesi et al., 2016). Efeitos na fertilidade podem ocorrer através de alterações nos tecidos-alvo, como o oviduto e o endométrio, que expressam receptores de P4 e E2 e cujas funções moduladas por esses esteroides incluem a produção de secreções (Robinson et al., 2001; Bazer e Slayden, 2008). A distribuição espacial e temporal dos receptores de E2 (ESR) e P4 (PGR) no oviduto e no útero é crítica para o estabelecimento da gestação em bovinos (Bazer et al., 2010; Shimizu et al., 2010; Gonella-Diaza et al., 2015). Desta forma, inadequações temporais ou de concentrações de esteroides sexuais bem como da expressão tecidual dos respectivos receptores em torno da ovulação podem afetar as funções ovidutais e endometriais e influenciar negativamente o crescimento do embrião e, conseqüentemente, o sucesso da gestação (Okumu et al., 2010). Resumidamente, durante o PEP o oviduto e o útero estão sob influência de eventos endócrinos sequenciais, caracterizados principalmente pelo desenvolvimento folicular e luteal, e das secreções de E2 e P4, as quais podem interferir com o status receptivo desses órgãos (Miller e Moore, 1976; Mesquita et al., 2014).

Algumas estratégias visam estimular o crescimento do POF no momento da IATF. Pode-se, por exemplo, reduzir as concentrações de P4 durante o desenvolvimento folicular, administrar eCG, que tem ação semelhante ao LH (Dias et al., 2009; Meneghetti et al., 2009; Peres et al., 2009) e/ou aumentar a duração do período entre a regressão do CL e a ovulação (i.e., o proestro; Bridges et al., 2008; Bridges et al., 2010; Ribeiro et al., 2012). A redução das concentrações de P4 aumenta a frequência pulsátil de secreção de LH (Kinder et al., 1996; Kojima et al., 2003), que estimula o desenvolvimento folicular (Kojima et al., 2003). Fêmeas de corte com um CL funcional durante o protocolo de sincronização da ovulação podem apresentar maiores concentrações de P4 nesse período. Para esses animais, a antecipação da regressão do CL durante o protocolo de sincronização pode proporcionar maiores taxas de prenhez (Dias et al., 2009; Meneghetti et al., 2009; Peres et al., 2009).

Mecanismos que controlam a maior fertilidade em vacas com POF maiores estão provavelmente relacionados a ambientes ovidutais e uterinos mais receptivos, gerados pela exposição sequencial a maiores concentrações de E2 no proestro e de P4 no diestro (Bridges et al., 2013; Jinks et al., 2013). Para aumentar a compreensão desses mecanismos, Mesquita et al. (2014) validaram um modelo em vacas Nelore cíclicas que estavam entre os dias 5 e 9 do diestro para formação dos grupos: Folículo Grande (FG; diâmetro médio do POF:  $13,2 \pm 0,3$  mm) e Folículo Pequeno (FP; diâmetro médio do POF:  $10,8 \pm 0,3$  mm). O grupo FG foi gerado pelo tratamento com prostaglandina (PGF) no momento da inserção do dispositivo de P4 para redução das concentrações de P4 durante o desenvolvimento folicular. Além disso, no grupo FG houve aumento do período de proestro através da retirada antecipada do dispositivo de P4, i.e. 42 a 60 h antes da indução da ovulação com GnRH. Em contraste, os animais do grupo FP não receberam PGF e a retirada do implante só ocorreu 12 a 24h depois. A fertilidade desse modelo para gerar POFs pequenos ou grandes através da redução das concentrações circulantes de P4 durante o desenvolvimento folicular foi testada por Pugliesi et al. (2016) em vacas de corte em lactação. Neste estudo, foi observado no grupo FP comparado ao grupo FG, menores taxas de ovulação (74,5% [41/55] vs. 90,9% [50/55]), expressão de estro (24% [5/21] vs. 82% [23/28]) e prenhez (30,9% [17/55] vs. 56,4% [31/55]). Fundamentalmente, esses estudos demonstraram que baixas concentrações de E2 no proestro e de P4 no diestro favorecem um fenótipo de baixa fertilidade, portanto, independente da categoria de vaca a ser trabalhada deve-se priorizar obter um ambiente endócrino similar ao proporcionado por um FG. Uma estratégia amplamente usada para estimular o crescimento do POF é pela administração da gonadotrofina coriônica equina (eCG) no final do protocolo de sincronização. Devido às suas ações gonadotróficas (Murphy e Martinuk, 1991), sua aplicação estimula o desenvolvimento folicular final, resulta em maior taxa de ovulação, tamanho do CL e taxa de prenhez (Dias et al., 2009; Peres et al., 2009; Sá Filho et al., 2010a e 2010c). Para revisão recente sobre esse tópico ver Bó et al. (2013; 2016).

Em protocolos de IATF, o aumento do intervalo entre a aplicação de PGF e a inseminação de 2 para 3 dias também tem sido usado para propiciar um maior período para o crescimento do POF sob baixas concentrações de P4. Tal procedimento melhorou as taxas de gestação em fêmeas de corte taurinas sincronizadas com protocolos curtos (manutenção do dispositivo intravaginal de P4 por 5/6 dias; De La Mata et al., 2015a; 2015b).

Finalmente, a adição de fonte exógena de E2 ao fim do protocolo de sincronização além de estimular a liberação de GnRH e a ovulação, serve para prover importante estímulo estrogênico ao útero sem influenciar a

progesteronemia pós ovulação. A importância de maiores concentrações de E2 nesse momento do protocolo para a fertilidade de bovinos de corte e leite já foi amplamente demonstrada (Sá Filho et al., 2011; Jinks et al., 2013; Pereira et al., 2013; 2016). A adição de uma fonte exógena de E2 (e.g., cipionato de E2) favorece a expressão de estro e a taxa de prenhez (Peres et al., 2009; Sá Filho et al., 2011; Pereira et al., 2016). Adicionalmente, Jinks et al. (2013) e Pereira et al. (2013) observaram efeitos benéficos do tratamento com E2 exógeno sobre a taxa de prenhez de vacas que apresentaram POFs pequenos no momento da IATF. Realmente, houve aumento de 36% no tamanho do concepto em vacas que expressaram estro comparado a fêmeas que não expressaram na IATF (Davoodi et al., 2016). Contudo, visando mimetizar farmacologicamente os efeitos fisiológicos da ovulação de um FG, juntamente com o uso da fonte exógena de E2 no proestro, preconiza-se a suplementação de P4 no diestro inicial em programas de IATF. De fato, Pugliesi et al. (2016) verificaram que a suplementação com 150 mg de P4 injetável 4 dias após IATF aumentou a taxa de prenhez no grupo FP (sem P4: 30,9% [17/55] vs. com P4: 44,7% [25/56]) mas não no grupo FG (sem P4: 56,4% [31/55] vs. com P4: 51,8% [28/54]). Adicionalmente, os autores também observaram efeito benéfico dessa suplementação em vacas Nelore múltiparas lactantes, sincronizadas com protocolo convencional a base de E2/P4, que apresentaram CLs menores ou iguais a 0,9 cm<sup>2</sup> no dia 4 pós IATF (sem P4: 40,4% [21/52] vs. com P4: 57,9% [22/38]). Em conjunto, esses dados suportam a ideia de que ambientes ovidutais e uterinos deficientes, gerados por baixas concentrações de E2 no proestro e de P4 no diestro, causados por exemplo pela indução da ovulação de um folículo pequeno, podem ser uma importante causa de falhas gestacionais.

Evidências se acumulam em suporte ao efeito positivo do aumento da disponibilidade e do período de exposição ao E2 durante o proestro/estro e da P4 no metaestro/diestro sobre a fertilidade de protocolos de sincronização. Tais incrementos podem ser determinados por modificações no funcionamento do oviduto e do útero que estimulam o crescimento do embrião e a sobrevivência do concepto. Apesar de associações entre o PEP e a preparação da receptividade ovidutal e endometrial em bovinos terem sido reportadas, os mecanismos exatos envolvidos na maior receptividade ainda são desconhecidos. Entretanto, usando o modelo proposto por Mesquita et al. (2014) para modulação do PEP com base no desenvolvimento diferencial do POF foi possível estudar o impacto do PEP em diversas vias importantes envolvidas nos ambientes uterino e ovidutal em vacas de corte.

No oviduto, 4 dias após a indução da ovulação, os animais do grupo FG possuíam uma maior abundância de receptores para E2 e P4, que levou a mudanças no transcriptoma (Gonella-Díaz et al., 2015). Funções como proliferação celular, morfogênese, secreção celular, remodelamento de matriz extracelular, homeostase e controle do estresse oxidativo encontram-se enriquecidas nos animais do grupo FG. Além disso, Gonella-Díaz e colaboradores (dados não publicados, 2017) descobriram que ovidutos de animais do grupo FG possuem número maior de células secretoras e uma maior área epitelial no oviduto. Isto poderia indicar que estes animais contam com uma maior capacidade de secreção de fluido ovidutal. Este fluido é indispensável para o desenvolvimento embrionário inicial, durante as etapas prévias à chegada do embrião ao útero. Estes achados sugerem que nos animais do grupo FG existe um ambiente mais favorável para os embriões, que levaria a melhora na fertilidade.

No endométrio, o PEP associado ao FG induziu alterações na expressão de receptores de esteroides sexuais, proliferação celular, metabolismo oxidativo e síntese de eicosanoides no útero, sem, no entanto, alterar o transporte de glicose para o lúmen uterino (França et al., 2015; Ramos et al., 2015; Mesquita et al., 2014; 2015; Oliveira et al., 2015). Mesquita et al. (2015) demonstraram que o PEP gerado pelo FG (altas concentrações de E2 e P4) programou o endométrio para que se tornasse biossinteticamente e metabolicamente mais permissivo ao estabelecimento da gestação. Nesse contexto, França e colaboradores (2017, dados não publicados), utilizaram o modelo animal proposto por Mesquita et al., (2014) para determinar que o PEP relacionado ao grupo FG modulou a via de transporte de aminoácidos (AA) no endométrio no dia 7 após a indução da ovulação. De fato, a abundância de transcritos relacionados ao transporte de AAs (SLC1A4, SLC6A1, SLC6A14, SLC7A4, SLC7A7, SLC7A8, SLC38A1, SLC38A7 e SLC43A) foi estimulada no grupo FG em comparação ao grupo FP. Adicionalmente, a disponibilidade dos AAs (valina, β-alanina e cistationina) foi maior no lavado uterino das vacas do grupo FG em comparação ao grupo FP. Neste período, a demanda embrionária por AAs aumenta (Partridge e Leese, 1996). Sugere-se que no dia 7, o transporte de AAs no útero dos animais do grupo FG é estimulado não só visando atender a demanda endometrial, mas também visando acúmulo de AAs nas secreções uterinas para atender às necessidades embrionárias.

### **Estratégias aplicadas após a ovulação**

A mortalidade embrionária entre os dias 8 e 16 do diestro é uma das principais causas de falha reprodutiva em bovinos, sendo responsável por até 40% das perdas embrionárias (Diskin and Sreenan, 1980; Diskin and Morris, 2008). Provavelmente, grande parte dessa mortalidade ocorre por falhas durante o período de reconhecimento materno da gestação. Nesse momento, dias 15 a 17 pós estro, a ocorrência de luteólise deve ser bloqueada pela liberação de interferon-tau (IFN-τ) pelo concepto (para revisão, veja Binelli et al., 2001), permitindo assim a manutenção da gestação. Postula-se que a competência do concepto em produzir suficiente

IFN- $\tau$  depende de estímulos uterinos. De fato, nos primeiros 7 dias pós estro, a P4 estimula a expressão de alguns genes relacionados com a síntese de histotrofo e metabolismo energético (Forde et al., 2009), que favorece o desenvolvimento embrionário (Garrett et al., 1988; Carter et al., 2008) e a produção de IFN- $\tau$  pelo concepto no momento adequado (O'hara et al., 2014a). Neste sentido, já é bem reportado que a taxa de prenhez é menor em novilhas (Diskin e Morris, 2008) e vacas (Starbuck, 1999; Stronge et al., 2005) com reduzida concentração de P4 no início do diestro. Baixas concentrações de P4 neste período reduzem o tamanho do concepto no dia 16 e consequentemente podem resultar em baixa secreção de IFN- $\tau$ , comprometendo a manutenção da prenhez (Mann e Lamming, 2001). Desta forma, estratégias pós-ovulatórias que promovam um aumento das concentrações de P4 no início do diestro podem favorecer o estabelecimento da gestação e consequentemente aumentar as taxas de prenhez, independente dos efeitos prévios da exposição dos tecidos reprodutivos ao E2 no proestro/estro.

Diversas estratégias para incremento das concentrações de P4 durante o diestro podem ser utilizadas, e incluem: 1) estimular o funcionamento do CL original (i.e., capacidade de produzir P4; Maillou et al., 2014); 2) formar um CL acessório no diestro (Rossetti et al., 2011; Nascimento et al., 2013); 3) empregar dispositivos intravaginais de P4 (Stevenson e Mee, 1991; O'hara et al., 2014a; Monteiro et al., 2015); 4) suplementar P4 de formulação injetável por aplicações diárias (Ginther, 1970; Beltman et al., 2009; Friedman et al., 2012); ou pelo uso de uma formulação de P4 injetável de longa ação (Pugliesi et al., 2014; Pugliesi et al., 2016). A administração de hCG entre os dias 3 e 4 pós estro aumentam o tamanho de tecido luteal e as concentrações de P4 circulante por volta dos dias 7 e 9 pós-estro (Maillou et al., 2014). Já a administração de GnRH ou LH (Martinez et al., 1999) ou mais comumente o tratamento com hCG entre os dias 5 e 7 do diestro (Rossetti et al., 2011; Nascimento et al., 2013) induzem a ovulação de um folículo dominante e a formação de CL acessório. Essa estratégia permite um aumento de P4 que é lento e gradual (~3 dias) em comparação à liberação de P4 oriunda de um dispositivo de P4, que permite um aumento já nas primeiras horas após a inserção (Nascimento et al., 2013). Similarmente ao dispositivo, o tratamento com P4 injetável, favorece o aumento rápido das concentrações de P4 mas se torna uma estratégia mais prática devido à necessidade de manejar os animais apenas uma vez (Pugliesi et al., 2014). Além disso, os efeitos positivos da P4 no endométrio parecem estar associados ao seu aumento rápido e transitório na circulação durante o diestro inicial. De fato, Yan et al. (2016) confirmaram recentemente em estudo de meta-análise com 19.040 vacas que os efeitos benéficos da P4 sobre a fertilidade estão associados ao aumento em sua concentração circulante entre os dias 3 e 7 do diestro. Apesar deste período mais favorável, os resultados dos estudos recentes que avaliaram o impacto da suplementação com P4 durante este período inicial do diestro são inconsistentes. De fato, efeitos positivos (Friedman et al., 2012; Monteiro et al., 2014; 2016; Pugliesi et al., 2016; Garcia-Ispierto et al., 2016; 2017) negativos (Monteiro et al., 2015; Parr et al., 2014) ou ausentes (Sampaio et al., 2015) sobre a taxa de prenhez já foram reportados.

Quanto ao local de ação da P4 administrada após a ovulação, sabe-se que a administração de P4 injetável (Garrett et al., 1988) ou o uso de dispositivo intravaginal de P4 (Carter et al., 2008) no início da prenhez eleva as concentrações de P4 e está associado positivamente ao tamanho do concepto no dia 14 (Garrett et al., 1988) e 16 (Carter et al., 2008) da gestação. Neste contexto, estudos foram realizados na tentativa de esclarecer se o efeito da P4 logo após a concepção é mediado por um efeito direto no embrião ou envolve mudanças no ambiente uterino. Muitas das ações da P4 são mediadas através da sua ligação ao seu receptor nuclear (PGR). Clemente et al. (2009) observaram mRNA para PGR em embriões bovinos, indicando que possivelmente haja um efeito da P4 diretamente no embrião. No entanto, neste mesmo estudo foi observado que a elevação nas concentrações de P4 anteriores à transferência de embriões no D7 resultou em aumento no comprimento do concepto no dia 14. Desta forma, parece que a presença do embrião não é necessária durante o período de altas concentrações de P4 para se ter um avanço na elongação do concepto (Clemente et al., 2009). Portanto, o efeito da P4 parece ocorrer não devido ao efeito direto no embrião, mas devido à mudanças no ambiente uterino em que o embrião irá se desenvolver. Adicionalmente, também não foi observado um efeito da P4 em meio de cultivo *in vitro* de embriões na proporção de zigotos desenvolvendo-se a blastocistos ou na qualidade do blastocisto (Rings et al., 2007; Clemente et al., 2009).

Apesar do positivo efeito embriotrófico, a suplementação de P4 no diestro inicial pode apresentar um efeito antagônico ao sucesso gestacional, já que em algumas condições resulta em maior incidência de luteólise precoce (O'hara et al., 2014a; Pugliesi et al., 2014). Esses efeitos podem ser mais ou menos intensos dependendo da combinação entre momento, via, dose e fonte de P4 administrada (Mann e Lamming, 1999). Dessa forma, O'Hara et al. (2014a) observaram que a inserção de dispositivo intravaginal de P4 no dia 3 (dia 0: estro) aumentou o desenvolvimento do concepto mas também a incidência de luteólise precoce. Por outro lado, o início do tratamento no dia 5 amenizou a incidência de luteólise precoce mas não afetou o desenvolvimento do concepto. Similarmente, Pugliesi et al. (2014) trabalhando com vacas Nelore observaram que o aumento da dose de P4 injetável, de 150 mg para 300 mg, e/ou a antecipação da administração de P4, de 3 para 2 dias após a ovulação, causou uma maior ocorrência de luteólise precoce.

A regressão antecipada do CL observada em animais tratados com P4 injetável pode ter pelo menos duas explicações: a inibição na formação de um CL funcional e/ou o desencadeamento prematuro do processo luteolítico no útero. O'Hara et al. (2014b), sugeriram que falhas no desenvolvimento luteal, provavelmente

causada pela menor frequência pulsátil de LH, podem estar envolvidas no processo de antecipação da luteólise. A suplementação com P4 injetável (100 mg) nos dias 1 ou 4, ou nos dias 3 a 5 pós estro com dispositivos intravaginais de P4 (1,55g) resultou em menores concentrações de P4 nos dias subsequentes ao fim da suplementação com P4, comparado ao grupo não tratado, indicando uma redução na funcionalidade do CL (Garrett et al., 1988; O'hara et al., 2014a). No entanto, em trabalho realizado por Pugliesi et al. (2014), a suplementação com P4 injetável de longa ação (150 ou 300 mg) no dia 3 pós-ovulação não afetou o tamanho e vascularização do CL nem as concentrações plasmáticas de P4 durante o desenvolvimento luteal. Entretanto, a luteólise ocorreu em média 3 dias antes em comparação aos animais não suplementados com P4. Para verificar a possibilidade de que haja um efeito direto da P4 promovendo a liberação precoce de pulsos luteolíticos de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  endometrial, Batista e colaboradores (2017, dados não publicados) trataram vacas Nelore com 0 ou 300 mg de P4 injetável no dia 3 pós-ovulação. Amostras de células endometriais foram coletadas transcervicalmente nos dias 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 16 utilizando-se escovas citológicas (“*cytobrush*”) para posterior análise de mRNA para os genes que codificam o receptor de P4 (PGR; associado à habilidade do endométrio em inibir a luteólise) e o receptor de ocitocina (OXTR; associado à liberação de pulsos luteolíticos de PGF). Observou-se uma maior proporção de animais com luteólise estrutural antecipada (luteólise até dia 16 pós-ovulação; P = 0,03) no grupo que recebeu P4 injetável (50%) em relação ao grupo controle (8,3%). Foi observada uma maior taxa de queda na abundância de transcritos para o gene PGR do dia 3 para o 5 no grupo que recebeu P4 injetável em comparação ao grupo controle (61% vs. 32%, P = 0,001). Isto sugere uma “downregulation” na transcrição dos receptores de PGR após o tratamento com P4 injetável. Tal evento poderia ter antecipado a responsividade uterina ao estradiol, acarretando assim em luteólise precoce neste grupo de animais. Ainda, vacas do grupo que recebeu P4 injetável e que apresentaram luteólise antecipadamente mostraram aumento precoce na abundância de transcritos para o gene OXTR. Uma vez que tal evento precede a liberação de pulsos luteolíticos de PGF endometrial, sugere-se que a regressão precoce do CL de animais tratados com P4 injetável seja estimulada, ao menos parcialmente, por sua ação no útero.

Em resumo, os resultados de fertilidade obtidos pela suplementação com P4 dependem de um equilíbrio entre seus efeitos embriotróficos e luteolíticos, ambos exercidos provavelmente no útero. Mais estudos são necessários para que se defina se tais efeitos são manipuláveis, mas já se sabe que são dependentes do momento, dose e via de administração da P4 suplementar. Um ponto final para consideração quando se visa incrementar o sucesso gestacional pela suplementação de P4 é a exposição a concentrações adequadas de E2 durante o proestro/estro, como comentado na seção anterior. O E2 está envolvido no controle de processos fisiológicos que contribuem para o estabelecimento da prenhez, incluindo efeito nas células foliculares, oócitos, transporte de gametas e preparação do ambiente uterino (Pohler et al., 2012). Desta forma, estratégias para aumentar a quantidade de E2 durante o proestro/estro, como o estímulo ao crescimento do POF ou suplementação exógena de E2, aliado a suplementação com P4 no início do diestro, podem resultar em maiores taxas de prenhez. Mais importante, o papel do E2 durante o proestro/estro pode ser determinante para o sucesso da estratégia de suplementação de P4 pós-ovulação.

### Uma nova perspectiva: a contribuição do embrião

O estabelecimento e manutenção da gestação são eventos complexos que requerem sintonia entre a receptividade ovidutal e uterina da fêmea e a capacidade do embrião em se desenvolver (Spencer et al., 2007). Assim, o sucesso gestacional pode ser atribuído à aptidão intrínseca do embrião, à receptividade endometrial e à interação destes fatores. Anteriormente foram abordados os controles endócrinos, com destaque para os esteroides ovarianos E2 e P4, da programação da receptividade em vacas de corte. Neste tópico serão abordados aspectos emergentes relacionados com os componentes parácrinos de origem embrionária no controle da receptividade uterina.

É bem estabelecido que após o início do processo de alongação, ocorre um aumento na capacidade do concepto (embrião e membranas extraembrionárias) em secretar interferon-tau (IFN-t), o qual inibe a liberação de pulsos luteolíticos de PGF e favorece a síntese de prostaglandina E2 (PGE2). Uma questão não resolvida é a partir de que momento o embrião/concepto ganha capacidade de regular o funcionamento do endométrio para apoiar seu desenvolvimento. Nos últimos anos, uma série de estudos mostraram a existência de uma complexa comunicação parácrina e endócrina entre o concepto e o tecido materno em bovinos (Forde et al., 2011; Bauersachs et al., 2012; Forde et al., 2012; Mamo et al., 2012) durante o período crítico do reconhecimento materno da gestação. No entanto, ainda não há relatos na literatura de que o embrião bovino module o funcionamento do endométrio antes da sua alongação, que só se inicia 13 dias após a IA.

Dados recentes do nosso grupo indicam que esta interação entre o embrião e o tecido materno ocorre localmente logo após a entrada do embrião no útero, 7 dias após a IA (Sponchiado et al., 2017, dados não publicados). Especificamente, amostras de endométrio de regiões específicas do corno uterino ipsilateral foram coletadas de vacas Nelore (*Bos indicus*) inseminadas e com gestação confirmada (n=10) e não-inseminadas (n=8). As amostras de endométrio foram analisadas por qPCR quanto à abundância de 87 transcritos associados com o funcionamento do endométrio. Verificou-se que a transcrição de 12 genes foi modulada pela presença do



embrião nas regiões mais craniais do corno uterino, onde o embrião estava localizado. Interessantemente, dos 12 genes cuja expressão foi diferente entre os grupos, quatro são genes estimulados pelo IFN-t (ISGs; *ISG15*, *MX1*, *MX3* e *OASY*), sendo mais abundantes na região útero-tubárica ipsilateral do grupo gestante. Outros três genes diferencialmente expressos estão associados com a via de biossíntese das prostaglandinas (*PTGES*, *AKR1C4* e *HPGD*). Estes resultados indicam que há uma sinalização iniciada pelo embrião via IFN-t no endométrio tão cedo quanto 7 dias após a IA, que estimula a transcrição de ISGs e, possivelmente, outros genes. Além disso, a proximidade física do embrião parece ser necessária para estimular o endométrio, provavelmente por causa da capacidade limitada de síntese e secreção de sinais pelo embrião nessa fase de desenvolvimento. Potenciais papéis do IFN-t nesta fase inicial são desconhecidos e merecem mais estudos. Especula-se que a programação dependente do embrião, associada ao controle endócrino dirigido pelos hormônios ovarianos, modulam a função endometrial para apoiar o desenvolvimento embrionário.

### Conclusão e perspectivas

Em programas de IATF em vacas de corte, procura-se mimetizar farmacologicamente os eventos ovarianos de modo a se obterem ovulações sincronizadas, tendo sido pouco priorizados os efeitos uterinos dessas práticas. Um ambiente uterino propício ao desenvolvimento do conceito é condicionado pela correta exposição do trato reprodutivo materno aos esteroides sexuais no período peri-ovulatório. Apresentaram-se acima estratégias para entregar ao trato reprodutivo os esteroides sexuais E2 e P4 em quantidades adequadas e nos momentos corretos em relação à ovulação visando estimular o crescimento do conceito e o sucesso gestacional. As estratégias incluem: (1) o gerenciamento do crescimento do folículo dominante pré-ovulatório visando aumentar as concentrações de E2 no proestro/estro e de P4 no diestro inicial, (2) a suplementação de E2 no proestro, (3) a suplementação de P4 no diestro inicial e (4) combinações dessas estratégias. Contudo, a obtenção da máxima eficiência de tais estratégias depende do aprofundamento da compreensão dos mecanismos de ação do E2 e da P4 no útero bovino. Deve-se considerar ainda que o embrião é capaz de modular o funcionamento do endométrio já na sua primeira semana de vida. Tal processo, apesar de não ser limitante à gestação, pode exercer um controle fino da receptividade, necessário à otimização das chances de sucesso gestacional.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP (2011/03226-4), CAPES e CNPq.

### Referências

- Bauersachs S, Wolf E.** Transcriptome analyses of bovine, porcine and equine endometrium during the pre-implantation phase. *Anim Reprod Sci*, v.134, p.84-94, 2012.
- Bazer FW, Slayden OD.** Progesterone-induced gene expression in uterine epithelia: a myth perpetuated by conventional wisdom. *Biol Reprod*, v.79, p.1008-1009, 2008.
- Bazer FW, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bayless K.** Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol Hum Reprod*, v.16, p.135-152, 2010.
- Beltman ME, Roche JF, Lonergan P, Forde N, Crowe MA.** Evaluation of models to induce low progesterone during the early luteal phase in cattle. *Theriogenology*, v.72, p.986-992, 2009.
- Binelli M, Pugliesi G, Hoeck VV, Sponchiado M, Ramos RS, Oliveira ML, França MR, D’Alexandri FL, Mesquita FS, Membrive CMB.** The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. *Anim Reprod*, v.11, p.246-253, 2014.
- Binelli M, Thatcher WW, Mattos R, Baruselli PS.** Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology*, v.56, p.1451-1463, 2001.
- Bó GA, Baruselli PS, Mapletoft RJ.** Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination. *Anim Reprod*, v.10, p.137-142, 2013.
- Bó GA, De La Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A.** Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology*, vol.86, p.388-396, 2016.
- Bridges GA, Day ML, Geary TW, Cruppe LH.** Triennial Reproduction Symposium: Deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *J Anim Sci*, vol.91, p.3002-3013, 2013.
- Bridges GA, Helser LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML.** Decreasing the interval between GnRH and PGF2a from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology*, v.69, p.843-851, 2008.
- Bridges GA, Mussard ML, Burke CR, Day ML.** Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim Reprod Sci*, v.117, p.208-215, 2010.
- Carter F, Forde N, Duffy P, Wade M, Fair T, Crowe MA, Evans ACO, Kenny DA, Roche JF, Lonergan P.** Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod Fertil Dev*, v.20, p.368-375, 2008.



- Clemente M, De La Fuente J, Fair T, Al Naib A, Gutierrez-Adan A, Roche JF, Rizos D, Lonergan P.** Progesterone and conceptus elongation in cattle: A direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction*, v.138, p.507-517, 2009.
- Davoodi S, Cooke RF, Fernandes ACDC, Cappelozza BI, Vasconcelos JLM, Cerri RLA.** Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on Day 19 of gestation in beef cows. *Theriogenology*, v.85, p.645-655, 2016.
- De la Mata JJ, Menchaca A, Bó GA.** Treatment with estradiol and progesterone that prolonged the proestrus. *Proceedings XI International Symposium on Animal Reproduction*, Institute of Animal Reproduction Cordoba (IRAC), Córdoba, Argentina, 2015a, p.143-158.
- De la Mata JJ, Ré M, Bó GA.** Combination of estrus detection and fixed-time artificial insemination in beef heifers following a shortened estradiol-based protocol that provides for a lengthened proestrus. *Reprod Fertil Dev*, 27, 2015b, p.96. Resumo.
- Dias CC, Wechsler FS, Day ML, Vasconcelos JLM.** Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. *Theriogenology*, v.72, p.378-385, 2009.
- Diskin MG, Morris DG.** Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.260-267, 2008.
- Diskin MG, Sreenan JM.** Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J Reprod Fertil*, v.59, p.463-468, 1980.
- Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans ACO, Spencer TE, Bazer FW, McBride R, Boland MP, O'gaora P, Lonergan P, Roche JF.** Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol Reprod*, v.81, p.784-794, 2009.
- Forde N, Carter F, Spencer TE, Bazer FW, Sandra O, Mansouri-Attia N, Okumu LA, McGettigan PA, Mehta JP, McBride R, O'Gaora P, Roche JF, Lonergan P.** Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant? *Biol Reprod*, v.85, p.144-56, 2011.
- Forde N, Mehta JP, Minten M, Crowe MA, Roche JF, Spencer TE, Lonergan P.** Effects of low progesterone on the endometrial transcriptome in cattle. *Biol Reprod*, v.87, p.124, 2012.
- França MR, Mesquita FS, Lopes E, Pugliesi G, Van Hoeck V, Chiaratti MR, Membrive CB, Papa PC, Binelli M.** Modulation of periovulatory endocrine profiles in beef cows: Consequences for endometrial glucose transporters and uterine fluid glucose levels. *Domest Anim Endocrinol*, v.50, p.83-90, 2015.
- Friedman E, Roth Z, Voet H, Lavon Y, Wolfenson D.** Progesterone supplementation postinsemination improves fertility of cooled dairy cows during the summer. *J Dairy Sci*, v.95, p.3092-3099, 2012.
- Garcia-Ispuerto I, López-Helguera I, Serrano-Pérez B, Paso V, Tuono T, Ramon A, Mur-Novales R, Tutusaus J, López-Gatius F.** Progesterone supplementation during the time of pregnancy recognition after artificial insemination improves conception rates in high-producing dairy cows. *Theriogenology*, v.85, p.1343-7, 2016.
- Garcia-Ispuerto I, López-Gatius F.** Progesterone supplementation in the early luteal phase after artificial insemination improves conception rates in high-producing dairy cows. *Theriogenology*, vol.90, p.20-24, 2017.
- Garrett JE, Geisert RD, Zavy MT, Morgan GL.** Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J Reprod Fertil*, v.84, p.437-446, 1988.
- Ginther O.** Effect of progesterone on length of estrous cycle in cattle. *American journal of veterinary research*, v.31, p.493-496, 1970.
- Gonella-Díaz AM, Da Silva Andrade SC, Sponchiado M, Pugliesi G, Mesquita FS, Van Hoeck V, De Francisco Strefezzi R, Gasparin GR, Coutinho LL, Binelli M.** Size of the ovulatory follicle dictates spatial differences in the oviductal transcriptome in cattle. *PloS One*, v.10, p.1-24, 2015.
- Jinks EM, Smith MF, Atkins JA, Pohler KG, Perry GA, Macneil MD, Roberts AJ, Waterman RC, Alexander LJ, Geary TW.** Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *J Anim Sci*, v.91, p.1176-1185, 2013.
- Kinder JE, Kojima FN, Bergfeld EGM, Wehrman ME, Fike KE.** Progesterin and Estrogen Regulation of Pulsatile LH Release and Development of Persistent Ovarian Follicles in Cattle. *J Anim Sci*, v.74, p.1424-1440, 1996.
- Kojima FN, Bergfeld EGM, Wehrman ME, Cupp AS, Fike KE, Mariscal-Aguayo DV, Sanchez-Torres T, Garcia-Winder M, Clopton DT, Roberts AJ, Kinder JE.** Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. *Anim Reprod Sci*, v.77, p.187-211, 2003.
- Maillo V, Duffy P, O'hara L, De Frutos C, Kelly A, Lonergan P, Rizos D.** Effect of hCG administration during corpus luteum establishment on subsequent corpus luteum development and circulating progesterone concentrations in beef heifers. *Reprod Fertil Dev*, v.26, p.367-374, 2014.
- Mamo S, Rizos D, Lonergan P.** Transcriptomic changes in the bovine conceptus between the blastocyst stage and initiation of implantation. *Anim Reprod Sci*, v.134, p.56-63, 2012.
- Mann GE, Lamming GE.** The Influence of Progesterone During Early Pregnancy in Cattle. *Reprod Domest*



Anim, v.34, p.269-274, 1999.

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

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

**Meneghetti M, Filho OGS, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM.** Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. *Theriogenology*, v.72, p.179-189, 2009.

**Mesquita FS, Pugliesi G, Scolari SC, França MR, Ramos RS, Oliveira M, Papa PC, Bressan FF, Meirelles FV, Silva LA, Nogueira GP, Membrive CMB, Binelli M.** Manipulation of the periovulatory sex steroid milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology*, v.81, p.861-869, 2014.

**Mesquita FS, Ramos RS, Pugliesi G, Andrade SCS, Van Hoeck V, Langbeen A, Oliveira ML, Gonella-Diaza AM, Gasparin G, Fukumasu H, Pulz LH, Membrive CM, Coutinho LL, Binelli M.** The Receptive Endometrial Transcriptomic Signature Indicates an Earlier Shift from Proliferation to Metabolism at Early Diestrus in the Cow. *Biol Reprod*, v.93, p.52-52, 2015.

**Miller BG, Moore NW.** Effects of progesterone and oestradiol on RNA and protein metabolism in the genital tract and on survival of embryos in the ovariectomized ewe. *Aust J Biol Sci*, v.29, p.565-573, 1976.

**Monteiro PL Jr, Ribeiro ES, Maciel RP, Dias AL, Solé E Jr, Lima FS, Bisinotto RS, Thatcher WW, Sartori R, Santos JE.** Effects of supplemental progesterone after artificial insemination on expression of interferon-stimulated genes and fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*, v.97, p.4907-21, 2014.

**Monteiro PL Jr, Nascimento AB, Pontes GC, Fernandes GO, Melo LF, Wiltbank MC, Sartori R.** Progesterone supplementation after ovulation: effects on corpus luteum function and on fertility of dairy cows subjected to AI or ET. *Theriogenology*, v.84, p.1215-24, 2015.

**Murphy BD, Martinuk SD.** Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev*, v.12, p.27-44, 1991.

**Nascimento AB, Souza AH, Guenther JN, Costa FPD, Sartori R, Wiltbank MC.** Effects of treatment with human chorionic gonadotrophin or intravaginal progesterone-releasing device after AI on circulating progesterone concentrations in lactating dairy cows. *Reprod Fertil Dev*, v.25, p.818-824, 2013.

**O'hara L, Forde N, Carter F, Rizos D, Maillo V, Ealy AD, Kelly AK, Rodriguez P, Isaka N, Evans ACO, Lonergan P.** Paradoxical effect of supplementary progesterone between day 3 and day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. *Reprod Fertil Dev*, v.26, p.328-336, 2014a.

**O'hara L, Forde N, Duffy P, Randi F, Kelly AK, Valenza A, Rodriguez P, Lonergan P.** Effect of combined exogenous progesterone with luteotrophic support via equine chorionic gonadotrophin (eCG) on corpus luteum development, circulating progesterone concentrations and embryo development in cattle. *Reprod Fertil Dev*, p.269-277, 2014b.

**Okumu LA, Forde N, Fahey AG, Fitzpatrick E, Roche JF, Crowe MA, Lonergan P.** The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *Reproduction*, v.140, p.143-153, 2010.

**Oliveira ML, D'Alexandri FL, Pugliesi G, Van Hoeck V, Mesquita FS, Membrive CM, Negrão JA, Wheelock CE, Binelli M.** Peri-ovulatory endocrine regulation of the prostanoid pathways in the bovine uterus at early dioestrus. *Reprod Fertil Dev*, 2015.

**Parr MH, Crowe MA, Lonergan P, Evans AC, Rizos D, Diskin MG.** Effect of exogenous progesterone supplementation in the early luteal phase post-insemination on pregnancy per artificial insemination in Holstein-Friesian cows. *Anim Reprod Sci*, v.150, p.7-14, 2014.

**Partridge RJ, Leese HJ.** Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev*, v.8, p.945-950, 1996.

**Pereira MHC, Rodrigues ADP, Martins T, Oliveira WVC, Silveira PSA, Wiltbank MC, Vasconcelos JLM.** Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: Comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol. *J Dairy Sci*, v.96, p.6904-6914, 2013.

**Pereira MHC, Wiltbank MC, Vasconcelos JLM.** Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. *J Dairy Sci*, v.99, p.2237-2247, 2016.

**Peres RFG, Júnior IC, Filho OGS, Nogueira GP, Vasconcelos JLM.** Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*, v.72, p.681-689, 2009.

**Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, Macneil MD, Roberts AJ, Geary TW.** Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.102, p.5268-5273, 2005.

**Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, Macneil MD, Geary TW.** Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J Anim Sci*, v.85, p.684-689, 2007.





- Pohler KG, Geary TW, Atkins JA, Perry GA, Jinks EM, Smith MF.** Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. *Cell Tissue Res*, v.349, p.649-664, 2012.
- Pugliesi G, Oliveria ML, Scolari SC, Lopes E, Pinaffi FV, Miagawa BT, Paiva YN, Maio JRG, Nogueira GP, Binelli M.** Corpus luteum development and function after supplementation of long-acting progesterone during the early luteal phase in beef cattle. *Reprod Domest Anim*, v.49, p.85-91, 2014.
- Pugliesi G, Santos FB, Lopes E, Nogueira É, Maio JRG, Binelli M.** Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. *Theriogenology*, v.85, p.1239-1248, 2016.
- Ramos RS, Oliveira ML, Izaguirry AP, Vargas LM, Soares MB, Mesquita FS, Santos FW, Binelli M.** The periovulatory endocrine milieu affects the uterine redox environment in beef cows. *Reprod Biol Endocrinol*, v.13, p.39, 2015.
- Ribeiro ES, Monteiro APA, Lima FS, Ayres H, Bisinotto RS, Favoreto M, Greco LF, Marsola RS, Thatcher WW, Santos JEP.** Effects of presynchronization and length of proestrus on fertility of grazing dairy cows subjected to a 5-day timed artificial insemination protocol. *J Dairy Sci*, v.95, p.2513-22, 2012.
- Rings F, Carter F, Hölker M, Kuzmany A, Besenfelder U, Havlicek V, Tesfaye D, Schellander K, Lonergan P.** Effect of elevated circulating progesterone concentration on development of in vitro produced bovine zygotes in vivo. *Reprod Fertil Dev*, v.20, p.147-148, 2007.
- Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Wathes DC.** Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*, v.122, p.965-979, 2001.
- Rossetti RC, Perdigão A, Mesquita FS, Sá Filho M, Nogueira GP, Machado R, Membrive CMB, Binelli M.** Effects of flunixin meglumine, recombinant bovine somatotropin and/or human chorionic gonadotropin on pregnancy rates in Nelore cows. *Theriogenology*, v.76, p.751-758, 2011.
- Sá Filho MF, Ayres H, Ferreira RM, Marques MO, Reis EL, Silva RCP, Rodrigues CA, Madureira EH, Bó GA, Baruselli PS.** Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology*, v.73, p.651-658, 2010a.
- Sá Filho MF, Crespilho AM, Santos JEP, Perry GA, Baruselli PS.** Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci*, v.120, p.23-30, 2010b.
- Sá Filho MF, Torres-Júnior JRS, Penteadó L, Gimenes LU, Ferreira RM, Ayres H, E Paula LAC, Sales JNS, Baruselli PS.** Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim Reprod Sci*, v.118, p.182-187, 2010c.
- Sá Filho MF, Santos JEP, Ferreira RM, Sales JNS, Baruselli PS.** Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology*, v.76, p.455-463, 2011.
- Sampaio PC, Alves NG, Souza JC, Sales JN, Carvalho RJ, Lima RR, Teixeira AA, Nogueira GP, Ascari IJ.** Comparative efficacy of exogenous eCG and progesterone on endogenous progesterone and pregnancy in Holstein cows submitted to timed artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, v.162, p.88-94, 2015.
- Shimizu T, Krebs S, Bauersachs S, Blum H, Wolf E, Miyamoto A.** Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium. *Physiol Genomics*, v.42, p.290-300, 2010.
- Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC.** Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. *Soc Reprod Fertil Suppl*, v.64, p.379-96, 2007.
- Starbuck G.** The importance of progesterone during early pregnancy in the dairy cow. *Cattle Practice*, v.7, p.397-400, 1999.
- Stevenson JS, Mee MO.** Pregnancy Rates of Holstein Cows After Postinsemination Treatment with a Progesterone-Releasing Intravaginal Device. *J Dairy Sci*, v.74, p.3849-3856, 1991.
- Stronge A, Sreenan JM, Diskin MG, Mee JF, Kenny DA, Morris DG.** Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*, v.64, p.1212-1224, 2005.
- Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC.** Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology Elsevier Sci*, v.56, p.307-314, 2001.
- Yan L, Robinson R, Shi Z, Mann G.** Efficacy of progesterone supplementation during early pregnancy in cows: A meta-analysis. *Theriogenology*, v.85, p.1390-1398, 2016.
-