Influência da progesterona injetável na taxa de prenhez de novilhas receptoras de embriões bovinos*

Influence of Injectable Progesterone on the Pregnancy Rate of Heifers Receiving Bovine Embryos

Caio Cezar da Silva¹, Helton Aparecido Garcia Gregianini¹, Jennifer Teodoro Ferreira Gregianini², José Antônio Dell'Aqua Júnior³, Jefferson Viana Alves Diniz⁴, Gerbson Francisco Nogueira Maia¹, Renato Mesquita Peixoto^{5,6} & Rafael Augusto Satrapa¹

ABSTRACT

Background: *In vitro* embryo production (IVEP) allows the spread of superior animal genetics, but pregnancy rates show a high variability with this biotechnology. In the initial stage of pregnancy, progesterone plays a fundamental role in uterine preparation, acting on embryonic growth, implantation, and development. However, on the day of the IVEP transfer to the recipients, progesterone levels may be lower than that expected, influencing the uterine environment and, consequently, the pregnancy rate. Therefore, the objective of this study was to evaluate the pregnancy rate in heifers after the administration of injectable progesterone (P4) in the fixed-time embryo transfer (FTET) protocol.

Materials, Methods & Results: The experiment was conducted inside a rural property near the city of Rio Branco, Acre, Brazil. The experimental group consisted of 232 animals, including 78 zebuine (*Bos indicus*) and 154 mixed (½ blood *B. indicus* and ½ blood *B. taurus*) animals, aged between 16 and 24 months, with a mean weight of 300 and 330 kg for zebuine and mixed animals, respectively. The selected animals were previously synchronized using the progesterone-estrogen-prostaglandin-estrogen protocol. Embryo transfer was performed on day 18 of the protocol, which was 9 days after the removal of intravaginal progesterone implant. On day 15 of the protocol, that is, 144 h (6 days) after the device removal, the animals were randomly distributed into two experimental groups: Control Group (CG; 0.5 mL of 0.9% saline solution, intramuscular) and Treated Group (P4G; 0.5 mL of injectable P4, 150 mg, intramuscular). Chi-square test was used for the statistical analysis of the pregnancy rate at a 5% probability. After 23 days of embryo transfer, pregnancy was diagnosed by ultrasonography. The general pregnancy rate, considering all groups (CG and P4G) and breeds included, was 55.17% (128/232). The pregnancy rates of the P4G and CG groups, regardless of breeds, were 55.08% (65/118) and 55.26% (63/114), respectively, with no statistical difference ($P = 0.8344$). Angus animals presented a similar pregnancy rate in the P4G and CG groups of 54.93% (39/71) and 57.83% (48/83), respectively. Furthermore, similar results were found for the Nellore breed, with no difference in pregnancy rate between the CG (55.81%, 24/43) and P4G (48.57%, 17/35) groups.

Discussion: The strategy of using P4 to increase the pregnancy rate is very widespread in fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols, although differences still exist. The literature presents zero or negative effects, as in this study, when exogenous P4 was used to increase endogenous P4 concentrations and, consequently, the pregnancy rate. However, some studies demonstrated the beneficial effects of increasing blood P4 concentrations, and that the increased fertility depends on the method and time of P4 supplementation and the animal's physiological state. In this context, the fact that the injectable progesterone supplementation did not increase the pregnancy rate in this study is justified mainly by factors such as the animal category used (heifers), time of P4 supplementation (day 4 after ovulation), biotechnology used (FTET), and the heterogeneous characteristics related to phases of the estrous cycle of heifers. Supplementation with 150 mg of injectable long-acting progesterone intramuscularly did not interfere in the pregnancy rate of Angus and Nellore heifers receiving bovine embryos.

Keywords: amazonian biome, bovine, embryo transfer, *in vitro* production.

Descritores: bioma amazônico, bovino, transferência de embriões, produção *in vitro*.

DOI: 10.22456/1679-9216.104573

Received: 3 June 2020

Accepted: 24 September 2020

Published: 17 October 2020

*Article based on a Dissertation submitted by the senior author in partial fulfillment of requirements for the Master of Science Degree. ¹Universidade Federal do Acre (UFAC), Rio Branco, AC, Brazil. ²In Vitro Acre Empresa Especializada na Produção de Embriões Bovinos, Rio Branco. ³Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho" (UNESP), Botucatu, SP, Brazil. ⁴Instituto Federal do Acre (IFAC), Campus Sena Madureira, AC. ⁵EMBRAPA Caprinos e Ovinos (CNPQ), Sobral, CE, Brazil. ⁶Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional - CNPq (DCR-CNPq/FUNCAP), Brasília, DF, Brazil. CORRESPONDENCE: C.C. Silva [caiomedvet11@gmail.com]. Laboratório de Reprodução Animal - UFAC, Rodovia BR 364. CEP 69920-900 Rio Branco, AC, Brazil.

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) permite difundir a genética superior dos animais, sendo a biotecnologia mais utilizada no melhoramento genético animal no Brasil [5]. A técnica constitui em embriões produzidos fora do organismo materno, em condições laboratoriais. Entretanto, a PIVE possui limitações, como a baixa taxa de embriões que atingem o estágio transferível (mórula e blastocisto), nascimentos de fetos anormais e o baixo índice de desenvolvimento embrionário após o processo de criopreservação [4].

Adicionalmente, as taxas de prenhez nessa biotécnica apresenta uma alta variabilidade, mas, em geral, fica entre 40 e 60% [17,21]. Inúmeros fatores podem influenciar estas taxas como, anormalidades cromossômicas, idade e qualidade dos embriões produzidos, sincronização da receptora, estado nutricional e os níveis séricos de progesterona [6].

A progesterona, na fase inicial da gestação, tem importante papel na preparação uterina, atuando nas funções de crescimento, implantação e desenvolvimento embrionário [11,12]. Todavia, no dia da transferência do embrião, os níveis de progesterona nas receptoras podem estar aquém do esperado, influenciando o ambiente uterino e, conseqüentemente, a taxa de prenhez [19]. Assim, enquanto o corpo lúteo (CL) ainda não atinge sua produção máxima, o uso da P4 exógena pode auxiliar na melhor preparação uterina e aumento dos níveis basais deste hormônio, podendo, conseqüentemente, melhorar as taxas de gestação de receptoras de embriões bovinos.

Portanto, objetivou-se avaliar a taxa de prenhez em novilhas após a administração de P4 injetável no protocolo de transferência de embriões em tempo fixo (TETF).

MATERIAIS E MÉTODOS

Localização e amostragem

O experimento foi realizado em uma propriedade rural próxima ao município de Rio Branco, Acre. O grupo experimental foi composto por 232 novilhas sendo, 154 mestiças (½ sangue *Bos indicus* e ½ sangue *B. taurus*) e 78 zebuínas (*B. indicus*), com idade entre 16 a 24 meses, com peso médio de 300 a 330 kg, criadas sob regime de pastejo extensivo com suplementação mineral *ad libitum*.

Os animais foram previamente selecionados com base na sua higidez clínica, estado reprodutivo

(animais cíclicos e não gestante) e normalidade da atividade ovariana, através de exame clínico e avaliação ultrassonográfica (US, transdutor retal de 5,0 a 8,0 MHz)¹.

Recuperação e classificação dos oócitos

Oócitos (Gir) obtidos através de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU - ovum pick up) em dias aleatórios do ciclo estral foram classificados de acordo com as suas características celulares em 4 categorias: I - oócitos com citoplasma homogêneo, circundados por 3 ou mais camadas compactas de células do *cumulus*; II - oócitos com menos de 3 camadas de células do *cumulus* ou parcialmente desnudos, porém com granulação homogênea no citoplasma; III - oócitos circundados apenas por células da corona radiata; IV - oócitos desnudos [7].

Maturação in vitro

Os Complexos *Cumulus oóforus* (COCs) classificados como categoria I, II e III foram lavados três vezes em meio TCM 199² com HEPES² contendo 10% de soro fetal bovino (SFB)³, 2 µg/mL de piruvato² e 75 µg/mL de gentamicina². Posteriormente, os oócitos foram lavados 2 a 3 vezes no meio de maturação e distribuídos em 4 gotas contendo 90 µL de meio de maturação, com média de 25 oócitos por gota, cobertas com 3,5 mL de óleo mineral em placas de Petri⁴ de 35 x 10 mm. O meio de maturação utilizado foi o TCM 199² com bicarbonato² contendo 10% de SFB³, 2 µg/mL de piruvato², 75 µg/mL de gentamicina², 20 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH)⁵ e 10 UI/mL de hormônio luteinizante - LH⁶. Os meios, preparados com 2 h de antecedência, foram mantidos a 39°C em incubadora⁷. A maturação dos COCs foi realizada em incubadora a 39 °C (5% de CO₂ em ar), durante 22 a 24 h.

Preparo do sêmen e fertilização in vitro

O descongelamento do sêmen (Holandês) foi realizado em água a 37°C por 30 s. Em seguida, o sêmen foi depositado sobre a superfície do gradiente de Percoll com densidade descontínua (2 mL a 45% sobre 2 mL a 90%) em tubo⁸ cônico de 15 mL e centrifugado em centrífuga (Excelsa® II 206 BL)⁹ a 900 g por 30 min.

Durante a centrifugação do sêmen, os oócitos já maturados foram lavados 3 vezes no meio TCM 199² com HEPES² e uma vez no meio de fertilização, antes de serem transferidos para gotas do mesmo meio

(fertilização) cobertas com 3,5 mL de óleo mineral em placas de Petri⁴ de 35 mm x 10 mm.

Após a centrifugação, os espermatozoides viáveis obtidos do sedimento foram submetidos à avaliação de motilidade e concentração (câmara de Neubauer) e diluídos em volume apropriado do meio de fertilização para se obter uma concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL.

Em seguida, foi realizada a fertilização dos oócitos utilizando 10 µL de sêmen diluído por gota. O processo de fertilização foi realizado por um período de 10 a 12 h a 39°C em 5% de CO₂ em ar. O meio de fertilização era composto por TALP-FIV suplementados com 6 mg/mL albumina de soro bovino (BSA)² livre de ácidos graxos, 2 µL/mL de piruvato², 75 µg/mL de gentamicina², 11 µg/mL de heparina² e 44 µL/mL de solução de Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina (PHE)².

Cultivo in vitro dos embriões

Os prováveis zigotos foram lavados em meio TCM 199² com HEPES² e por último, em meio de cultivo, sendo então transferidos para gotas de meio de cultivo de 90 µL (20 a 25 zigotos por gota), cobertas com óleo mineral, em placas de Petri⁴ de 35 mm. Utilizou-se o meio de cultivo SOF (synthetic oviduct fluid), livre de SFB³, acrescidos de BSA² (5%) e piruvato de sódio² (0,2%).

Preparação das receptoras para a sincronização da ovulação

A preparação dos animais para a sincronização da ovulação foi realizada por um protocolo de duração de 31 dias. Os animais receberam protocolo vacinal para doenças reprodutivas, primeira dose no D0 (Fertiguard[®])¹⁰, acompanhada de uma aplicação de suplementação mineral injetável (Fosfosal[®])¹¹; no D21 foi aplicado o reforço da vacina e realização do exame ginecológico por avaliação ultrassonográfica. Os animais não cíclicos foram submetidos a um protocolo de indução da puberdade conforme metodologia de Lemes [10].

Tal protocolo teve duração de 10 dias sendo realizado da seguinte maneira: D21, aplicação de 150 mg de P4 injetável [IM, Sincrogest[®] injetável]¹² e no D31 aplicação de 1 mg de benzoato de estradiol [IM, Sincrodiol[®] injetável]¹² e de 150 µg de D-Cloprostenol [IM, Sincrocio[®] injetável]¹².

Sincronização da ovulação

Os animais selecionados (n= 232) foram previamente sincronizados por meio de protocolo PEPE

(progesterona-estrógeno-prostaglandina-estrógeno) onde, em um dia aleatório do ciclo estral, foi implantado um dispositivo intravaginal de Cronipres[®] Mono Dose¹² [progesterona 1 g], seguido da aplicação de Bioestrogen^{®12} [1,0 mg de benzoato de estradiol]. Oito dias depois foram administrados Croniben^{®12} [75 µg D-Cloprostenol intramuscular (IM)], Ecegon^{®12} [200 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) injetável] e Croni-Cip^{®12} [0,5 mg de cipionato de estradiol] com posterior remoção do dispositivo intravaginal de progesterona.

A transferência dos embriões mestiços Girolando ½ sangue foi realizada no dia 18 do protocolo, 9 dias após a remoção do implante intravaginal de progesterona.

Procedimento experimental

Após 144 h (6 dias) da retirada do dispositivo, os animais (232 novilhas) foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais: Grupo controle (GC)- [administração de 0,5 mL de solução fisiológica a 0,9%, via intramuscular IM] e Grupo P4 (GP4)- [administração de 0,5 mL de progesterona injetável, 150 mg, IM; P4300[®]]⁶. Assim, dos 154 animais mestiços (½ sangue *B. indicus* e ½ sangue *B. taurus*), 71 englobaram o grupo controle (GC) e 83 o grupo P4 (GP4); enquanto isso, dos 78 animais zebuínos (*B. indicus*), 43 fizeram parte do grupo controle (GC) e 35 do grupo P4 (GP4).

O diagnóstico de gestação dos animais foi realizado por ultrassonografia, 23 dias após a transferência de embrião.

Análise estatística

Para análise estatística da taxa de prenhez, os dados foram arranjados em tabelas de contingências e analisados pelo teste de Qui-quadrado, a 5% de probabilidade (R Core Team (2019))¹³.

RESULTADOS

A taxa de prenhez total, considerando ambos os grupos (GC e GP4) e ambas as raças (Angus e Nelore), foi de 55,17% (128/232).

Quando analisado somente o tratamento e desconsiderando as raças, a taxa de prenhez dos animais dos GC e GP4 foi de 55,26% (63/114) e 55,08% (65/118), respectivamente, não sendo observado diferença significativa ($P = 0,8344$). Por sua vez, quando comparada à taxa de prenhez entre as raças estudadas e desconsiderando o tratamento, também não foi obser-

vado diferença significativa entre os animais das raças Angus (56,49%; 87/154) e Nelore (52,56%; 41/78).

Na Figura 1, verifica-se que na raça Angus, quando a taxa de prenhez foi analisada, observou-se que não houve diferença significativa entre os

grupos GP4 (57,83%; 48/83) e GC (54,93%; 39/71). O mesmo foi observado nos animais da raça Nelore, onde a taxa de prenhez do grupo GP4 (48,57%; 17/35) não diferiu ($P = 0,6824$) das do grupo controle (55,81%; 24/43)

Figura 1. Taxa de prenhez dos animais das raças Angus (½ sangue *Bos indicus* e ½ sangue *Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*), tratados (GP4) ou não (GC) com progesterona injetável.

DISCUSSÃO

A estratégia do uso da P4, objetivando o incremento na taxa de prenhez, é bastante difundida em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), embora haja ainda divergências entre diversos autores [3,13,14,20,25]. Na presente pesquisa, o uso de progesterona injetável não aumentou a taxa de prenhez, tanto na raça Angus quanto na Nelore. Efeitos nulos ou negativos, também foram descritos na literatura ao utilizar P4 com fins de aumento da concentração endógena de P4 e, consequentemente, da taxa de gestação [11,16,25]. Adicionalmente, tem-se notado que, em novilhas de aptidão leiteira, a administração de um análogo de GnRH (buserelina) no 14º dia do protocolo de TETF proporcionou aumento nos níveis endógenos de progesterona, mas sem acarretar aumentos na taxa de gestação dos animais [4], como relatado nesse trabalho.

Há evidências que demonstram que a suplementação de P4 de ação prolongada nos primeiros dias pós-ovulação aumenta as concentrações de P4 por três dias, mas, desencadeia influência negativa no desenvolvimento e função do corpo lúteo pós ovulação, provavelmente ligado a antecipação da luteólise [13,18,19].

Desse modo, a baixa eficiência da suplementação de P4 injetável no presente estudo, possivelmente pode estar relacionado à antecipação da síntese de PGF e da luteólise que comumente são entraves atribuídos a esse tipo de suplementação hormonal [1,13,14,18].

Ademais, a suplementação de 150 mg/IM de P4 injetável 4 dias após a inovulação embrionária pode ter sido eficiente em aumentar as concentrações de P4 circulantes, mas este provável aumento não foi acompanhado pelo incremento na taxa de prenhez no grupo tratado. Em estudos com a administração de 300 mg/IM de P4 injetável em vacas multíparas não lactantes, foi observado não apenas a antecipação do início da luteólise ocorrendo 3 dias antes dos animais não tratados, mas também a regressão acentuada do corpo lúteo e expressão de genes no lúmen uterino que indicaram a síntese precoce de PGF endometrial [1].

Alguns autores relatam que um aumento na concentração de P4, em determinado momento do ciclo estral, estimula a expressão de genes que apoiam o desenvolvimento do embrião e a produção de IFN- τ no momento mais apropriado para se manter a prenhez [24,26]. Além disso, a redução nas perdas gestacionais,

após a concepção, possivelmente está relacionada ao aumento nas concentrações de progesterona no início da gestação [8]. Desse modo, concentrações elevadas de P4 promovem redução basal de PGF2 α durante a gestação, e o interferon-t (IFNT) fetal regula a secreção desses agentes luteolíticos. Assim, em animais com baixa concentração de progesterona, esta inibição é menos efetiva e o mecanismo luteolítico desenvolve-se precocemente, não permitindo ao conceito tempo adequado para seu alongamento e produção de interferon trofoblástico para bloquear a luteólise [19,27].

Contudo, é válido salientar, que o incremento na fertilidade está condicionado ao método, ao momento e a duração da suplementação com P4. Neste sentido, tem-se evidenciado que vacas leiteiras suplementadas com P4 por meio do dispositivo intravaginal aumentaram sua fertilidade, fato esse já não constatado em vaca de cortes utilizando o mesmo tratamento [9]. Em outro estudo, constatou-se que a suplementação de P4 por meio do dispositivo intravaginal elevou a taxa de prenhez, e que associado a GnRH no 5° e no 13° dia após a inseminação artificial (IA) tenham aumentado a concentração sérica de P4 em vacas leiteiras [15].

Ademais, há indícios que a eficácia do uso exógeno de P4 pode variar conforme o estado fisiológico dos animais. Em pesquisas que compararam as concentrações de P4 em vacas lactantes e em novilhas, os autores observaram que as novilhas possuíram maior concentração sérica de P4 em relação às vacas lactantes e que as perdas gestacionais foram mais elevadas nas vacas lactantes, quando comparadas às novilhas [23]. Não obstante, ainda há estudos que relatam que a concentração de P4 circulante no organismo é dependente do fluxo sanguíneo que chega ao fígado, sendo maior em vacas em lactação, o que justifica a menor concentração de P4 nesta categoria animal [25]. Estes achados corroboram a importância do uso da P4 nos protocolos de TETF, principalmente em vacas.

Salienta-se ainda que segundo alguns autores, a melhora na taxa de prenhez depende da fase do ciclo estral que precede o início do protocolo de IATF e que exista um intervalo ideal para se utilizar a suplementação com P4 de longa ação como fonte exógena, nos protocolos de IATF, a fim de proporcionar melhor desenvolvimento embrionário e de reconhecimento da gestação [2]. Outros estudos observaram redução na taxa de prenhez em vacas com anestro persistente em comparação com vacas leiteiras cíclicas [22,24].

Com isso, supõe-se que a condição da ciclicidade antes da utilização de P4 exógeno ou quando utilizam hormônios que estimulem o surgimento da fase luteínica otimizam os efeitos positivos na taxa de prenhez e reduz as perdas gestacionais subsequentes.

Na literatura, tem-se evidenciado que a administração de P4 injetável 5 dias após a IATF eleva a taxa de prenhez de 8% [1], resultado contrário do presente experimento. Entretanto, essa discrepância entre os estudos provavelmente ocorreu pela diferença na biotecnologia utilizada (IATF vs. TETF), pelo momento da administração da progesterona (5 dias vs. 4 dias após a ovulação) e pela categoria animal utilizada (vaca vs. novilha).

Nesse contexto, o fato da suplementação de progesterona injetável, no presente trabalho, não ter incrementado a taxa de prenhez, vai de encontro com o observado por diversos outros estudos relatados anteriormente. E, em geral, justifica-se principalmente por fatores como, a categoria animal utilizada (novilhas), o momento da suplementação de P4 (4° dia após a inovulação), a biotecnologia utilizada (TETF) e as características heterogêneas em relação as fases do ciclo estral das novilhas.

CONCLUSÃO

A suplementação com 150 mg de progesterona injetável de longa ação por via intramuscular não alterou a taxa de prenhez de novilhas receptoras de embriões bovinos, tanto na raça Angus quanto na Nelore.

MANUFACTURERS

¹Mindray. Shenzhen, China.

²ThermoFisher Scientific. Waltham, MA, USA.

³Difco Laboratories. Sparks, MD, USA.

⁴Corning Incorporated. Nova York, NY, USA.

⁵Ceva Veterinária S.A. Paulínia, SP, Brazil.

⁶UCB Biopharma. São Paulo, SP, Brazil.

⁷Techno Plastic Products AG. Trasadingen, Switzerland

⁸Fanem® Ltda. Guarulhos, SP, Brazil.

⁹Vallée - MSD Saúde Animal. Montes Claros, MG, Brazil.

¹⁰Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

¹¹Ourofino Saúde Animal. Cravinhos. SP, Brazil.

¹²Biogénesis Bagó. Vinhedo, SP, Brazil.

¹³Foundation for statistical Computing. Vienna, Austria.

Acknowledgments. To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support; to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the scholarships of R.M. Peixoto.

Ethical approval. This work is part of the Dissertation of the first author. The research project was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of Universidade Federal do Acre under number 058/2018.

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

REFERENCES

- 1 Batista E.O.S., Cardoso B.O., Oliveira M.L., Cuadros F.D.C., Mello B.P., Sponchiado M., Monteiro B.M., Pugliesi G. & Binelli M. 2019. Supplemental progesterone induces temporal changes in luteal development and endometrial transcription in beef cattle. *Domestic Animal Endocrinology*. 68: 126-134.
- 2 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: 368-375.
- 3 Couto S.R.B., Guerson Y.B., Ferreira J.E., Silva O.R., Silenciato L.N., Barbero R.P. & Mello M.R.B. 2019. Impact of supplementation with long-acting progesterone on gestational loss in Nelore females submitted to TAI. *Theriogenology*. 125: 168-172.
- 4 Galimberti A.M., Fonseca F.A., Araújo M.C.C., Costa E.P., Freitas C., Guimarães J.D. & Ferreira A.M. 2001. Taxa de prenhez e Níveis Plasmáticos de Progesterona, em Receptoras de Embrião Bovino, Tratadas com Buserelina após a Inovação. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 30(2): 353-359.
- 5 Gonçalves R.L.R. & Viana J.H.M. 2019. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 43(2): 156-159.
- 6 Hansen P.J. & Ealy A.D. 1991. Effects of heat stress on the establishment and maintenance of pregnancy in cattle. In: *Anais do 9º Congresso Brasileiro de Reprodução Animal* (Belo Horizonte, MG, Brazil). pp.108-119.
- 7 Khurana N.K. & Niemann H. 2000. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*. 54(5): 741-756.
- 8 Kenyon A.G., Mendonça L.G.D., Lopes Junior G., Lima J.R., Santos J.E.P. & Chebel R.C. 2013. Minimal progesterone concentration required for embryo survival after embryo transfer in lactating Holstein cows. *Animal Reproduction Science*. 136(4): 223-230.
- 9 Larson J.E., Lamb G.C., Stevenson J.S., Johnson S.K., Day M.L., Geary T.W., Kesley D.J., DeJarnette J.M., Schrick N., DiCostanzo A. & Arseneau J.D. 2006. Synchronization of estrus in suckled beef cows for detected estrus and artificial insemination and timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone, prostaglandin F, and progesterone. *Journal of Animal Science*. 84(2): 332-342.
- 10 Lemes K.M. 2017. Comparação da eficiência de diferentes formulações à base de progesterona para indução da puberdade e desempenho reprodutivo em novilhas da raça Nelore. 79f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
- 11 Lonergan P. 2011. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology*. 76(9): 1594-1601.
- 12 Mann G.E. & Lamming G.E. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*. 121(1): 175-180.
- 13 Martins T., Pugliesi G., Sponchiado M., Cardoso B.O., Gomes N.S., Mello B.P., Celeghini E.C.C. & Binelli M. 2018. Supplementation with long-acting progesterone in early diestrus in beef cattle: I. effect of artificial insemination on onset of luteolysis. *Domestic Animal Endocrinology*. 67: 63-70.
- 14 Martins T., Pugliesi G., Sponchiado M., Cardoso B.O., Silva K.R., Celeghini E.C.C. & Binelli M. 2018. Supplementation with long-acting progesterone in early diestrus in beef cattle: II. Relationships between follicular growth dynamics and luteolysis. *Domestic Animal Endocrinology*. 68: 1-10.
- 15 Mehni S.B., Shabankareh H.K., Kazemi-Bonchenari M. & Eghbali M. 2012. The comparison of treating Holstein dairy cows with progesterone, CIDR and GnRH after insemination on serum progesterone and pregnancy rates. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(1): 131-134.
- 16 Nishimura T.K. 2018. Influências da condição corporal e atividade ovariana sobre a taxa de prenhez de vacas de corte suplementadas com progesterona de longa ação após a IATF. 72f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

- 17 Nonato Jr. I., Rufino F.A., Sanches B.V., Pontes J.H.F., Uvo S., Ereno Jr. J.C. & Seneda M.M. 2004. Produção de embriões em vacas nelore com a utilização associada de FIV e TE. In: *Resumo da 18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de embriões* (Barra Bonita, RS, Brazil). p.95.
- 18 O'Hara L., Forde N., Duffy P., Randi F., Kelly A.K., Valenza A., Rodriguez P. & Lonergan P. 2014. Effect of exogenous progesterone combined with luteotrophic support via equine chorionic gonadotropin (eCG) on the development of the corpus luteum, circulating concentrations of progesterone and embryonic development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*. 28(3): 269-277.
- 19 Pugliesi G., Oliveira M.L., Scolari S.C., Lopes E., Pinaffi F.V., Miagawa B.T., Paiva Y.N., Maio J.R.G., Nogueira G.P. & Binelli M. 2014. Corpus Luteum Development and Function after Supplementation of Long-Acting Progesterone During the Early Luteal Phase in Beef Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. 49(1): 85-91.
- 20 Pugliesi G., Santos F.B., Lopes E., Nogueira E., Maio J.R.G. & Binelli M. 2016. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. *Theriogenology*. 85(7): 1239-1248.
- 21 Scanavez A.L., Campos C.C. & Santos R.M. 2013. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 65(3): 722-728.
- 22 Santos J.E.P., Thatcher W.W., Chebel R.C., Cerri R.L.A. & Galvão K.N. 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science*. 82: 513-535.
- 23 Silva J.C., Costa L.L. & Silva J.R. 2002. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*. 58(1): 51-59.
- 24 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.
- 25 Wiltbank M.C., Lopez H., Sartori R., Sangsritavong S. & Gümen A. 2006. Changes in Reproductive Physiology of Lactating Dairy Cows Due to Elevated Steroid Metabolism. *Theriogenology*. 65(1): 17-29.
- 26 Wiltbank M.C., Souza. A.H., Carvalho P.D., Cunha A.P., Giordano J.O., Fricke P.M., Baez G.M. & Diskin M.G. 2014. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. *Animal*. 8(1): 70-81.
- 27 Woclawek-Potocka I., Brzezicka E. & Skarzynski D.J. 2009. Lysophosphatic acid modulates prostaglandin secretion in the bovine endometrial cells differently on days 8-10 of the estrous cycle and early pregnancy. *Journal of Reproduction and Development*. 55(4): 393-399.