

Contribuição dos ovários e do útero para manutenção da gestação em gado de corte

Michael F. Smith¹, Ky G. Pohler¹, George A. Perry², Jacqueline A. Atkins¹, Emma Jinks¹, Fernanda Abreu³,
and Thomas W. Geary⁴

¹Division of Animal Sciences, University of Missouri, Columbia, MO

²Department of Animal and Range Sciences, South Dakota State University, Brookings, SD

³Department of Animal Science, Ohio State University, Columbus, OH

⁴Livestock and Range Research Laboratory, USDA-ARS, Miles City, MT

Pontos a serem lembrados:

O uso do hormônio GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) para induzir ovulação do folículo dominante fisiologicamente imaturo diminuiu a taxa de prenhez e diminuiu a sobrevivência da gestação tanto no estágio embrionário mais avançado quanto no estágio fetal.

A taxa fertilização em vacas doadoras foi diretamente influenciada pela concentração de estradiol no momento da inseminação, pelo tamanho do folículo ovulatório, e pela quantidade de dias pós-parto.

Prenhez 27 dias após a inseminação artificial em vacas receptoras foi diretamente influenciada pela concentração de estradiol no momento da inseminação e pela concentração de progesterona no momento da transferência de embrião, e indiretamente influenciada pelo tamanho do folículo ovulatório. Concentração de estradiol no momento da inseminação foi diretamente associada à taxa de prenhez e foi a variável mais consistente com efeito na fertilidade. Alta concentração de estradiol em vacas no momento da inseminação é importante para fertilização bem sucedida e também para a manutenção da gestação.

Manutenção da prenhez em vacas receptoras foi diretamente influenciada pela qualidade embrionária.

O entendimento dos fatores que afetam o estabelecimento e a manutenção da prenhez é complexo e necessita da consideração simultânea de diversas variáveis; e grande parte da biologia fundamental sobre o estabelecimento e a manutenção da gestação ainda não foram elucidados.

Introdução

A sincronização do desenvolvimento do folículo dominante e o controle da ovulação são tecnologias da reprodução assistida comumente usadas em bovinos. A maturação final do folículo dominante é intimamente ligada à maturação final do ovócito, à secreção pré-ovulatória de estradiol, à secreção pós-ovulatória de progesterona, ao controle endócrino do oviduto, ao ambiente uterino para os gametas, e ao desenvolvimento embrionário. A maturidade do folículo dominante/ovulatório pode afetar o estabelecimento e a manutenção da prenhez. Indução da ovulação de um folículo dominante que ainda não atingiu a maturidade fisiológica pode reduzir as taxas de prenhez e aumentar a morte embrionária avançada/fetal em bovinos, que é provavelmente mediada através da competência inadequada do ovócito e um ambiente materno comprometido. A competência do ovócito aumenta com a maturidade folicular; e a secreção pré-ovulatória de estradiol é a reflexão da maturidade folicular, afetando o ovócito, as células foliculares, o oviduto e o útero. O corpo lúteo é a continuação da maturação folicular, e a taxa de secreção de progesterona após a ovulação está ligada à fertilidade. O avanço na compreensão de como o microambiente folicular afeta o estabelecimento e a manutenção da prenhez, provavelmente, aumentará as taxas de prenhez à inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

Os protocolos de sincronização de ovulação em bovinos com o intuito de realizar a inseminação artificial em tempo fixo comumente inclui uma injeção de GnRH (GnRH-1) para induzir a ovulação e a formação do corpo lúteo assim como a emergência de uma nova onda folicular. Após 5 a 7 dias, as vacas recebem uma injeção de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF) para indução da luteólise, e entre 60 a 72 horas (dia 0) após PGF, a injeção de GnRH (GnRH-2) é efetuada para induzir a ovulação (Figura 1). A inseminação ocorrerá no momento em que a segunda injeção de GnRH (GnRH-2) for administrada. Indução da ovulação com GnRH de folículos ≤ 11 mm em diâmetro resultou em diminuição da taxa de prenhez e aumentou a mortalidade embrionária avançada (Perry et al., 2005). Essa diminuição na fertilidade foi associada à menor concentração de estradiol na circulação no dia da inseminação, à diminuição na taxa de aumento da progesterona após a inseminação, e, finalmente, à diminuição na circulação da concentração de progesterona. Ao contrário, o tamanho do folículo ovulatório não teve efeito aparente na fertilidade quando a ovulação ocorreu espontaneamente. Folículos submetidos à ovulação espontânea ovulam em uma ampla variedade de tamanhos quando estão fisiologicamente maduros. Portanto, vacas com um folículo dominante pequeno que recebem uma injeção de GnRH podem ser induzidas a ovular antes que o folículo tenha atingido sua maturidade fisiológica. Indução da ovulação com GnRH de folículos fisiologicamente imaturos têm impacto negativo na taxa de prenhez e na

sobrevivência do embrião avançado/feto. Essas observações em bovinos têm implicações nos protocolos de sincronização do estro em que a ovulação induzida pelo GnRH ocorre no momento da inseminação.

Para determinar por que as taxas de prenhez diminuem após a indução da ovulação com o GnRH de folículos dominantes pequenos, um experimento de transferência recíproca de embriões (RET) foi realizado para entender como o tamanho do folículo ovulatório afeta o estabelecimento e a manutenção da prenhez em vacas de corte pós-parto (Atkins, 2009; Atkins et al., 2010a). O delineamento do experimento RET e os resultados estão descritos abaixo.

Delineamento do Experimento

Esse experimento foi conduzido durante 3 estações de monta consecutivas em vacas de corte pós-parto em lactação. O cronograma para a coleta de dados em cada ano está ilustrado na Figura 2. Vacas de corte em lactação (n = 2,550) foram sincronizadas com o protocolo CO-Synch (GnRH [GnRH-1] no dia -9, PGF no dia -2, e GnRH [GnRH-2] no dia 0 concomitante com a inseminação artificial em tempo fixo[IA]), porém somente as vacas que não exibiram estro antes ou depois da aplicação do GnRH-2 (n = 1,164) foram utilizadas. Peso corporal e escore de condição corporal (escala de 1 a 9, em que 1 = muito magra e 9 = obesa) foram obtidos no dia -9 (GnRH-1) do experimento. Vacas doadoras (n = 810) foram inseminadas por 1 dos 3 inseminadores, com o sêmen de um touro (três coletas). Embriões (n = 394) ou ovócitos (n = 45) individuais foram obtidos das doadoras através da lavagem do corno uterino 7 dias após a IA (dia 0), e todos os embriões vivos (n = 354) foram transferidos para as receptoras no mesmo dia. Os embriões de vacas que ovularam folículos pequenos (< 12.5 mm) ou grandes (\geq 12.5 mm) foram transferidos em vacas que ovularam um folículo grande ou pequeno, para remover a co-linearidade de tamanho do folículo 7 dias antes ou depois da prenhez; grupos: “pequeno para pequeno” (S-S; n = 71), “pequeno para grande” (S-L; n = 111), “grande para pequeno” (L-S; n = 122), e “grande para grande” (L-L; n = 50). O grupo “pequeno para pequeno” foi usado como controle negativo uma vez que essas transferências eram esperadas em resultar na menor taxa de prenhez. Da mesma forma, o grupo “grande para grande” era esperado em resultar na maior taxa de prenhez, e então foi usado como o controle positivo. O grupo de transferência “pequeno para grande” foi criado para testar o efeito da transferência de um embrião derivado de um folículo ovulatório pequeno para um ambiente uterino estabelecido por um folículo ovulatório grande na taxa de prenhez. Em caso de a taxa de prenhez ser similar à do grupo “pequeno para pequeno” poderia indicar um problema na competência do ovócito. O grupo de transferência “grande para pequeno” foi criado para testar o efeito da transferência de um

embrião derivado de um folículo ovulatório grande para um ambiente uterino estabelecido por um folículo ovulatório pequeno na taxa de prenhez. Em caso de a taxa de prenhez resultante ser semelhante à do grupo “pequeno para pequeno” poderia refletir um problema no ambiente materno.

As análises estatísticas foram guiadas por diagramas (“path analyses”) em que as relações de causa-efeito potenciais entre as variáveis mensuradas foram usadas como hipóteses (Wright, 1934). Comparações de característica única de mecanismos biologicamente complexos (ex: prenhez) pode levar à conclusões diferentes em comparação à análise de diagramas (“path analyses”). Por exemplo, uma análise do efeito do tamanho do folículo ovulatório na taxa de prenhez pode sugerir um efeito estatístico significativo. No entanto, o efeito pode não ser devido ao tamanho do folículo ovulatório, mas sim à quantidade de estradiol secretada pelo folículo antes da ovulação e (ou) pela quantidade de progesterona secretada pelo corpo lúteo formado após a ovulação. A análise de diagramas (“path analyses”) permite que múltiplas variáveis biologicamente importantes (ex: tamanho do folículo ovulatório, secreção de estradiol, secreção luteal de progesterona, e taxa de prenhez) sejam contabilizadas em uma única análise, podendo resultar em um nível mais profundo de compreensão do que quando se considera qualquer variável sozinha. Os “valores r ” descritos abaixo são coeficientes da regressão linear padronizados, que são semelhantes aos coeficientes de correlação simples para medir a força da influência de uma variável sobre a outra. Um “valor r ” de aproximadamente 1.0 reflete uma forte associação; enquanto um valor próximo à zero, reflete uma associação baixa ou nenhuma relação entre as duas variáveis. Um “valor r ” positivo significa uma associação positiva; enquanto um “valor r ” negativo, significa uma associação negativa entre as duas variáveis.

Fatores que afetam a ciclicidade e a resposta ovulatória ao GnRH-1

A proporção de vacas ciclando no início do experimento foi afetada positivamente pelos dias pós-parto ($r = 0.17$), peso corporal ($r = 0.10$), e escore de condição corporal ($r = 0.07$). Consequentemente, as vacas que estavam ciclando no início do experimento tenderam a ser mais pesadas, estavam em melhor condição corporal, e tiveram mais dias pós-parto do que as vacas em anestro. Estes dados enfatizam a importância do manejo adequando das vacas para a obtenção de uma condição corporal adequada ao parir, e para parir cedo, o que resultará no aumento do número de dias pós-parto no início da estação de monta.

A proporção de vacas que ovularam em resposta ao GnRH-1 no início do protocolo CO-Synch foi de 59% (564/949). O fato de uma vaca ter ovulado ou não em resposta ao GnRH-1 foi diretamente

afetado pelo o fato da mesma estar ou não ciclando ($r = -0.20$), pelos dias pós-parto ($r = 0.13$), e pelo peso corporal ($r = 0.07$). As vacas que estavam ciclando antes da injeção de GnRH-1 foram as menos propensas a ovularem no início do protocolo de sincronização, e esse efeito foi de 1.5 a 2.9 vezes mais importante do que o efeito de dias pós-parto ou peso corporal. As vacas que ovularam em resposta ao GnRH-1 tiveram aumento na taxa de crescimento do folículo ovulatório entre a PGF e o GnRH-2, e resultaram folículos com maior diâmetro no momento do GnRH-2. Esses resultados confirmam os resultados de um estudo anterior, em que a ovulação em resposta ao GnRH-1 e a sincronização de uma nova onda folicular resultaram em um folículo de diâmetro maior no momento do GnRH-2 em vacas de corte pós-parto (Atkins et al., 2010b). A resposta ovulatória após o GnRH-1 provavelmente afetou a idade do folículos induzidos a ovular após GnRH-2. O fato de alguns folículos não ovularem em resposta ao GnRH-1 pode ter resultado na presença de um folículo mais velho no momento do GnRH-2 em algumas vacas, que exibiram estro antes da administração do GnRH-2, e então, foram removidas do estudo.

Do ponto de vista de manejo, a proporção de vacas que têm um folículo dominante capaz de responder ao GnRH-1 pode ser aumentada através da pré-sincronização das mesmas. Uma outra opção seria a administração de estrógeno no momento da inserção do CIDR, o que resulta em melhor controle da onda folicular do que o GnRH, uma vez que o estrógeno atua diminuindo o FSH e independe da presença de um folículo dominante no momento da inserção do CIDR (Day et al., 2010).

Fatores que afetam o tamanho do folículo ovulatório no momento do GnRH-2

O tamanho do folículo ovulatório no momento do GnRH-2 foi positivamente afetado pela taxa de crescimento folicular entre as administrações da PGF e do GnRH-2 ($r = 0.32$), pelo peso corporal ($r = 0.14$), e pelos dias pós-parto ($r = 0.08$); e negativamente afetado pelo estado de ciclicidade ($r = -0.09$) e pela progesterona sérica no momento da PGF ($r = -0.15$). Portanto, as vacas com um folículo ovulatório maior no momento do GnRH-2 eram mais pesadas, tiveram mais dias pós-parto, menor progesterona sérica no momento da PGF, e maior taxa de crescimento folicular entre a PGF e o GnRH-2, do que as vacas que tiveram um folículo ovulatório menor. É interessante notar que o tamanho do folículo ovulatório no momento do GnRH-2 foi maior em vacas em anestro do que em vacas ciclando; porém, a razão para esse fato ainda não está clara. Uma vez que o corpo lúteo é uma continuação da maturação folicular, o fato do tamanho do folículo no momento do GnRH-2 ser positivamente correlacionado com o

volume luteal e com a concentração sérica de progesterona na transferência de embrião (TE) não é surpreendente ($r = 0.46$ e 0.31 , respectivamente).

Fatores associados à fertilização

A taxa de fertilização (90%) foi positivamente associada à concentração sérica de estradiol no momento da inseminação ($r = 0.16$), ao peso corporal ($r = 0.16$), aos dias pós-parto ($r = 0.14$), e ao tamanho do folículo ovulatório ($r = 0.10$); e negativamente associada à idade da vaca ($r = -0.16$). Portanto, a fertilização bem sucedida foi maior em vacas com maior concentração sérica de estradiol no momento da inseminação, em vacas com um período pós-parto mais longo, com um folículo ovulatório maior, e em vacas mais pesadas e mais jovens. A indução da ovulação de um folículo dominante que não tenha atingido a maturidade fisiológica pode resultar na liberação de um ovócito com menor capacidade de ser fertilizado e de formar um embrião viável.

A taxa de fertilização em gado de corte é normalmente alta ($\geq 90\%$; Sreenan and Diskin, 1983), e os resultados do experimento RET indicam que a taxa de fertilização é diminuída quando o tamanho do folículo ovulatório, a concentração sérica de estradiol, o peso corporal da vaca, e os dias pós-parto são menores. Estratégias de manejo para aumentar a taxa de fertilização na IATF deveriam incluir: 1) Utilização de protocolos de IATF que aumentam a maturidade fisiológica do folículo ovulatório (ex: secreção de estradiol); 2) Aumentar a proporção de fêmeas que emprenham no início da estação de monta, o que diminuirá a estação de parição e, conseqüentemente, aumentará a quantidade de dias pós-parto no momento da próxima inseminação; 3) Certificar que as vacas possuem peso corporal adequado no momento da sincronização de estro.

Fatores que afetam a concentração de estradiol e progesterona perto do momento da inseminação

O estado endócrino perto do momento da inseminação artificial tem impacto importante no estabelecimento da prenhez, e foi caracterizado através da determinação das concentrações séricas de progesterona no dia da aplicação da PGF, estradiol na inseminação, e progesterona na transferência de embrião. Elevadas concentrações séricas de progesterona no ciclo anterior à concepção tem sido associada ao aumento das taxas de concepção (Folman et al., 1973; Fonseca et al., 1983; Bello et al., 2006). Enquanto não se sabe ao certo como elevadas concentrações séricas de progesterona no ciclo

anterior afetam a taxa de concepção, especula-se que a competência do ovócito seja comprometida quando a concentração circulante de progesterona no ciclo anterior à inseminação seja baixa.

Progesterona no momento da administração da PGF: Os três fatores seguintes tiveram efeito positivo direto e importante na concentração sérica de progesterona no momento da PGF: 1) Ovulação em resposta ao GnRH-1 ($r = 0.36$), que é provavelmente devido à indução da formação do tecido luteal; 2) Aumento da proporção de vacas ciclando no momento do GnRH-1 ($r = 0.30$); e 3) Escore de condição corporal ($r = 0.10$). Ciclicidade estral e resposta ovulatória ao GnRH-1 teve maior efeito positivo na concentração sérica de progesterona no momento da PGF, com contribuição adicional relativamente pequena do aumento do escore de condição corporal. Variáveis que tiveram efeitos negativo na concentração sérica de progesterona no momento da PGF foram o aumento da idade da vaca e maior quantidade de dias pós-parto.

Estradiol no momento da inseminação artificial: Concentração sérica de estradiol e tamanho do folículo ovulatório no momento da inseminação foram positivamente correlacionados ($r = 0.46$). Não foi possível atribuir a causa e o efeito destas duas variáveis, uma vez que aumento no número de células foliculares pode aumentar a secreção de estradiol, e esse aumento de estradiol pode afetar diretamente a secreção de estradiol pelas células da granulosa. Concentração sérica de estradiol no momento da inseminação foi afetado positivamente pela resposta ovulatória ao GnRH-1 ($r = 0.07$) e progesterona no momento da PGF ($r = 0.05$), e negativamente associada com a taxa de crescimento folicular ($r = -0.07$). O efeito da resposta ovulatória ao GnRH-1 na concentração sérica de estradiol no momento da inseminação enfatiza a importância de aumentar a proporção de vacas responsivas ao GnRH-1.

Progesterona no momento da Transferência de Embrião (dia 7): A taxa de crescimento da concentração da progesterona após a inseminação é positivamente associada à taxa de prenhez em bovinos (Mann and Laming, 2001; Perry et al., 2005; Bridges et al., 2010). No experimento RET os seguintes três fatores tiveram efeito direto na concentração sérica de progesterona no dia da transferência embrionária (7 dias após o GnRH-2): 1) Concentração sérica de estradiol no momento da inseminação ($r = 0.26$); 2) Concentração sérica de progesterona na PGF ($r = 0.23$); e 3) Tamanho do folículo ovulatório ($r = 0.21$). Alterações no estradiol e/ou na progesterona perto do momento da inseminação pode alterar o ambiente ovidutal e uterino e, conseqüentemente, afetar o sucesso da fertilização. O estradiol pode afetar o ambiente ovidutal e uterino através da mudança do pH uterino (Elrod and Butler, 1993; Perry and Perry, 2008), alterando o transporte e a longevidade espermática (Allison et al., 1972; Hawk, 1983) para melhorar o sucesso da fertilização, secreções do oviduto (como

por exemplo a glicoproteína ovidutal; Buhi, 2002), e indiretamente, estimular a atividade da progesterona através dos receptores de progesterona no útero (Stone et al., 1978; Zelinski et al., 1982; Ing and Tornesi, 1997).

Os mecanismos associados à viabilidade embrionária, estágio de desenvolvimento embrionário, e qualidade do embrião no momento da transferência de embrião

Viabilidade embrionária: A porcentagem de embriões mortos no dia 7 após a inseminação foi de apenas 6%, e os principais fatores que contribuíram para a morte embrionária incluem folículos ovulatórios pequenos ($r = 0.17$), baixa concentração sérica de progesterona no momento da PGF ($r = 0.15$), aumento no peso corporal ($r = 0.11$), e rápida taxa de crescimento do folículo dominante ($r = 0.10$). Baixa progesterona na administração da PGF pode indicar falha ao ovular após a injeção de GnRH-1 e, talvez, a formação de um folículo persistente que ovulou em resposta ao GnRH-2. Ovócitos de folículos persistentes podem ser fertilizados, porém, os embriões normalmente morrem no estágio de 16 células (Ahmed et al., 1995).

Estágio de desenvolvimento embrionário: A maioria dos embriões coletados no experimento RET estavam no estágio de mórula seguido pela blastocisto inicial, mórula inicial, embrião de 2 a 12 células, blastocisto e blastocisto expandido ($n = 221, 79, 54, 19, 9, \text{ e } 1$). Os principais fatores que afetaram diretamente o desenvolvimento de estágio embrionário foram: a viabilidade embrionária ($r = 0.49$), tamanho do folículo ovulatório ($r = -0.13$), idade da vaca ($r = -0.13$), concentração sérica de progesterona no dia em que os embriões foram coletados (dia 7; $r = 0.11$), e taxa de crescimento do folículo ovulatório ($r = 0.10$). Estes dados indicam que a fertilização de um ovócito originado de um folículo grande pode resultar em um embrião mais viável, porém em um estágio de desenvolvimento mais atrasado do que um ovócito originado de um folículo ovulatório pequeno. Além disso, a fertilização de um ovócito originado de um folículo com uma rápida taxa de crescimento pode estar em um estágio de desenvolvimento mais avançado, porém, menos viável do que a fertilização um ovócito originado de um folículo que cresceu a um ritmo mais lento. Os mecanismos subjacentes às previsões anteriores não são claros, mas podem envolver diferenças na modificação epigenética do genoma do ovócito que afeta o controle do desenvolvimento embrionário, e a sincronia entre o embrião e o ambiente materno. Não é de estranhar que o aumento na concentração sérica de progesterona no dia 7 teve efeito positivo no estágio de desenvolvimento embrionário uma vez que elevadas concentrações de progesterona na

circulação durante o desenvolvimento embrionário inicial foram demonstrados aumentar as taxas de prenhez.

Qualidade embrionária: De todos os fatores que foram avaliados, somente o tamanho do folículo ovulatório teve efeito significativo na qualidade embrionária. Foi observado que com o aumento do tamanho folicular houve também aumento na qualidade embrionária. Embora o tamanho do folículo ovulatório foi negativamente associado ao estágio de desenvolvimento embrionário, foi positivamente associado à qualidade e viabilidade do embrião. Assim, o tamanho do folículo ovulatório pode ser um indicador da competência do ovócito.

Mecanismos associados ao estabelecimento da prenhez

Após avaliar o efeito de doze ou mais fatores na taxa de prenhez no dia 27, foi possível apenas identificar 10% da variação na taxa de prenhez. Portanto, grande parte da biologia subjacente ao estabelecimento e à manutenção da prenhez em bovinos continua a ser determinada. O estabelecimento da prenhez no dia 27 após a inseminação foi influenciado positivamente pela concentração sérica de progesterona no dia 7 ($r = 0.23$), concentração sérica de estradiol no momento da inseminação ($r = 0.20$), e idade da vaca ($r = 0.10$). Taxa de prenhez no dia 27 foi negativamente influenciada pelo tamanho do folículo ovulatório ($r = -0.17$). Os efeitos positivos do estradiol e da progesterona foram independentes e aparentemente ajudaram no estabelecimento de um ambiente materno propício para o estabelecimento da prenhez (Inskeep, 2004). O efeito negativo do tamanho do folículo ovulatório na taxa de prenhez foi inesperada. Uma vez que o tamanho do folículo ovulatório teve efeito negativo no estágio de desenvolvimento embrionário, o efeito negativo do tamanho do folículo ovulatório pode refletir incapacidade do embrião em produzir o sinal de reconhecimento materno da prenhez antes do início da luteólise.

Mecanismos associados à manutenção da prenhez

A indução da ovulação com o GnRH de um folículo dominante pequeno resultou no aumento da mortalidade embrionária tardia/fetal em vacas de corte pós-parto (Perry et al., 2005). A maioria das perdas embrionárias tardias/fetal ocorreram próximo ao momento da fixação do embrião na parede uterina (do dia 27 ao 41; Inskeep, 2004). Este é o momento em que a mortalidade embrionária tardia/fetal foi relatada por outros pesquisadores (Tabela 1), e pode ser devido à má formação da

placenta. No estudo RET, a manutenção da prenhez foi diretamente afetada pela qualidade do embrião ($r = 0.19$), e pela idade da receptora ($r = 0.14$). Consequentemente, a mortalidade embrionária tardia/fetal foi associada à embriões de baixa qualidade e também à vacas mais jovens. A associação positiva entre a qualidade do embrião e as taxas de prenhez já foram relatadas anteriormente (Donaldson, 1985; Hasler, 2001).

O desenvolvimento de um método para prever vacas que têm uma maior probabilidade de apresentar morte embrionária tardia/fetal seria de grande utilidade. As glicoproteínas associadas à prenhez bovina (bPAGs) são expressadas nas células trofoblásticas binucleadas da placenta, e podem ser detectadas na circulação materna a partir dos dias 24 a 26 de prenhez (Figura 3; Pohler et al., 2010). A família bPAG tem sido utilizada para diagnóstico de gestação e para monitorar a viabilidade embrionária/fetal, bem como a função placentária em bovinos. No estudo RET, as vacas em que ocorreu a mortalidade embrionária tardia/fetal obtiveram diminuição significativa em bPAGs no dia 28 da gestação, apesar de todas as vacas possuírem um feto viável, baseado na presença do batimento cardíaco (Figura 4). Estes dados sugerem que a concentração sérica de bPAGs no 28º dia de prenhez pode ser usado para o diagnóstico da manutenção da gestação, e também para prever a sobrevivência embrionária/fetal até pelo menos o 72º dia de gestação, que corresponde ao período mais crítico para a mortalidade embrionária ou fetal.

Resumo

Em bovinos, a taxa de fertilização seguida da inseminação geralmente é de $> 90\%$, porém a taxa de prenhez no momento mais precoce de diagnóstico (dia 27) é geralmente $< 70\%$. Vacas induzidas à ovular folículos pequenos após a injeção de GnRH resultaram na diminuição das taxas de prenhez e no aumento da taxa de perda embrionária, mesmo depois da prenhez ter sido estabelecida. Essas ineficiências são provavelmente devidas à ovulação de um ovócito imaturo, que resultará no comprometimento da fertilização e da sobrevivência embrionária, ou devido à ovulação ter ocorrido antes da total maturação das células foliculares, resultando na produção insuficiente de estradiol durante o período pré-ovulatório e, subsequentemente, produção inadequada de progesterona para a preparação do ambiente uterino e, consequentemente, o estabelecimento da prenhez. Neste artigo descrevemos o estudo de transferência recíproca de embrião (RET), que foi projetado para diferenciar os efeitos foliculares na qualidade do ovócito e o ambiente uterino na prenhez bem sucedida em bovinos de corte. A análise em diagramas ("path analysis") foi utilizada para descrever as relações entre os

fatores de uma matriz complexa que afetam o sucesso da gestação. O ambiente folicular da vaca doadora afetou a taxa de fertilização e a sobrevivência embrionária antes do dia 7, porém a sobrevivência depois do dia 7 foi principalmente dependente do tamanho do folículo ovulatório, produção de estradiol, e subsequente produção de progesterona nas vacas receptoras, e amplamente independente dos efeitos das vacas doadoras. Os dados fornecidos neste trabalho demonstram as inúmeras variáveis que contribuem para estabelecimento de prenhez bem sucedido. O aumento da concentração de estradiol no momento da inseminação em bovinos e, provavelmente em todas as espécies, é crucialmente importante para a fertilidade e a sobrevivência embrionária.

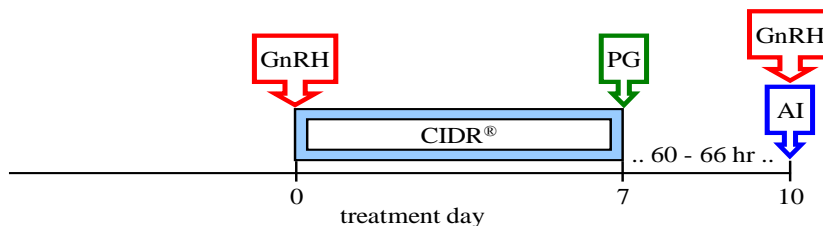
Referências

- Ahmad, N., F.N. Schrick, R.L. Butler, and E.K. Inskeep. 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. Reprod.* 52:1129-1135.
- Allison, A.J., and T.J. Robinson. 1972. The recovery of spermatozoa from the reproductive tract of the spayed ewe treated with progesterone and oestrogen. *J Reprod Fertil* 31:215.
- Atkins, J. A. 2009. Ovulatory follicle size and pregnancy in beef cattle. PhD Dissertation. University of Missouri, Columbia.
- Atkins, J.A., M.F. Smith, M.D. MacNeil, E.M. Jinks, and T.W. Geary. 2010a. Contributions of follicle size to establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows using reciprocal embryo transfer. *Proceedings 8th International Ruminant Reproduction Symposium.* p117.
- Atkins, J.A., M.F. Smith, K.J. Wells and T.W. Geary. 2010b. Factors affecting preovulatory Follicle diameter and ovulation rate after gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part II: Anestrous Cow. *J Anim Sci* 88:2311-2320.
- Beal, W.E., R.C. Perry, and L.R. Corah. 1992. The use of ultrasound in monitoring reproductive physiology of beef cattle. *J. Anim. Sci* 70:924-929.
- Bello, N.M., J.P. Steibel, and J.R. Pursley. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 89:3413-3424.
- Bridges, G. A., M. L. Mussard, C. R. Burke, and M. L. Day. 2010. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 117:208-215.
- Buhi W.C. 2002. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* 123:355-362.
- Day, M.L., M.L. Mussard, G.A. Bridges, and C.R. Burke. 2010 Controlling the dominant follicle in beef cattle to improve estrous synchronization and early embryonic development. *Society for Reproduction and fertility Volume* 67:405-419.
- Donaldson, L.E. 1985. Matching of embryo stages and grades with recipient oestrous synchrony in bovine embryo transfer. *Vet Rec.* 9:489-491.
- Elrod, C. C. and W.R. Butler. 1993. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J. Anim. Sci.* 71:694-701.

- Folman, Y., M. Rosenberg, Z. Herz, and M. Davidson. 1973. The relationship between plasma progesterone concentration and conception in postpartum dairy cows maintained on two levels of nutrition. *J. Reprod. Fert.* 34:267-278.
- Fonseca F.A., J.H. Britt, B.T. McDaniel, and J.C. Wilk. 1983 Reproductive traits of holsteins and jersey. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. *J Dairy Sci* 66:1128-1147.
- Hasler, J. F. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56:1401-1415.
- Hawk H.W. 1983. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *J Dairy Sci* 66:2645-2660.
- Ing N.H, and M.B. Tornesi. 1997 Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol Reprod* 56:1205-1215
- Inskip, E.K. 2004. Preovulatory, postovulatory and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J. Anim. Sci.* 82:(E-Sup)E24-39.
- Lamb, G.C. 2002. Reproductive real-time ultrasound technology: An application for improving calf crop in cattle operations. In Fields, MJ, RS Sand, and JV Yelich. (Eds), *Factors Affecting Calf Crop: Biotechnology of Reproduction*. CRC Press, Boca Raton, FL, p 231-253.
- Mann, G.E., and G.E. Lamming. 2001. Relationship between the maternal endocrine environment, early embryo development and the inhibition of the luteolytic mechanism in the cow. *Reproduction* 121, 175–180.
- Perry, G.A., M.F. Smith, M.C. Lucy, J.A. Green, T.E. Parks, M.D. MacNeil, A.J. Roberts, and T.W. Geary. 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 102:5268-5273.
- Perry, G.A., and B.L. Perry. 2008. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. *Domestic Anim. Endo.* 34:333-338.
- Pohler, K.G., J.A. Atkins, E.M. Jinks, C.L. Johnson, M.F. Smith J.A. Green, M.D. MacNeil and T.W. Geary. 2010. Circulating concentrations of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) are associated with embryo/fetal survival but not ovulatory follicle size in suckled beef cows. *Proceedings 8th International Ruminant Reproduction Symposium*. P119.
- Sreenen, J.M. and M.G. Diskin. 1983. Early embryonic mortality in the cow: Its relationship with progesterone concentration. *Vet. Rec.* 112:517-521.
- Stevenson, J.S., S.K. Johnson, M.A. Medina-Bristos, A.M. Richardson-Adams, and G.C. Lamb. 2003 Resynchronization of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen, progesterone, or both. *J. Anim. Sci.* 81:1681-1692.
- Stone, G.M., L. Murphy, B.G. Miller. 1978 Hormone receptor levels and metabolic activity in the uterus of the ewe: Regulation by oestradiol and progesterone. *Aust J Biol Sci* 31:395-403.
- Zelinski, M.B., P. Noel, D.W. Weber, F. Stormshak. 1982 Characterization of cytoplasmic progesterone receptors in the bovine endometrium during proestrus and diestrus. *J Anim Sci* 55:376-383.

7-day CO-Synch + CIDR®

Perform TAI at 60 to 66 hr after PG with GnRH at TAI.



5-day CO-Synch + CIDR®

Perform TAI at 72 ± 2 hr after 1st PG with GnRH at TAI.

Two injections of PG 8 ± 2 hr apart are required for this protocol.

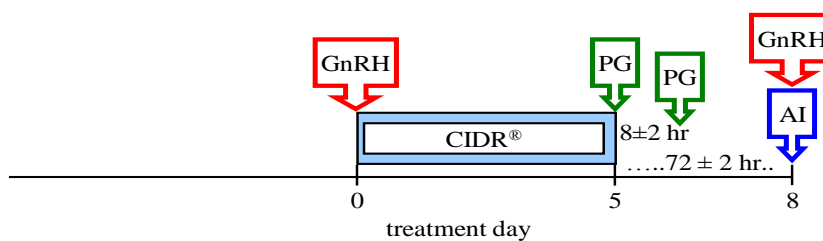


Figura 1. Métodos recomendados atualmente para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. GnRH = hormônio liberador de gonadotropina; PG = prostaglandina $F_{2\alpha}$; CIDR = dispositivo intravaginal; AI = inseminação artificial

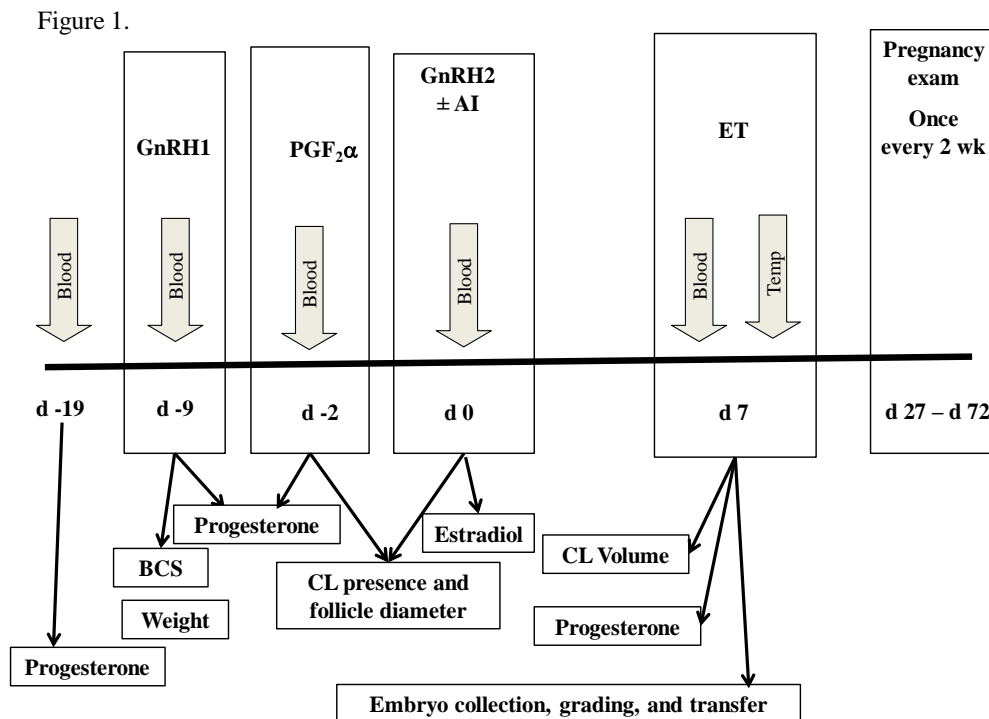


Figura 2. Delineamento experimental. Os tratamentos foram baseados no tamanho do folículo no momento do GnRH-2 tanto das vacas receptoras como das doadoras. Os embriões coletados das vacas que ovularam folículos pequenos (< 12.5 mm) ou folículos grandes (≥ 12.5 mm) foram transferidos para receptoras que ovularam folículos pequenos ou grandes, resultando nos seguintes grupos/tratamentos: “pequeno para pequeno” (n = 71; controle negativo); “pequeno para grande” (n = 111; avaliar o efeito da competência do ovócito); “grande para pequeno” (n = 122; avaliar o efeito do ambiente materno); e “grande para grande” (n = 50; controle positivo). Inclui dados de 1,164 ovulações únicas em vacas de corte em lactação, que foram tratadas com o protocolo CO-Synch (GnRH-1 no dia -9, PGF no dia -2, e GnRH-2 com [vacas doadoras; n = 810] ou sem [vacas receptoras; n = 354] inseminação artificial [AI] em tempo fixo no dia 0). Coleta, classificação e transferência do embrião (ET) foi efetuada 7 dias após a administração do GnRH-2. Diagnóstico de prenhez foi iniciado entre os dias 27 e 29 (dia 0 = GnRH-2) e continuou a cada duas semanas até os dias 72-74. Blood = coleta de sangue para quantificação das concentrações séricas de progesterona e estradiol; Temp = temperatura retal; BCS = escore de condição corporal

Tabela 1. Mortalidade embrionária/fetal em novilhas de corte e vacas de corte em lactação

Bovinos de corte	Número de prenhez	Dias prenhe no diagnóstico		Intervalo (dias)	Perda da prenhez (%)	Referência
		First	Second			
Novilhas	149	30	60	30	4.0	Lamb (2002)
Novilhas	271	35	75	40	4.1	Lamb (2002)
Novilhas	105	30	90	60	4.8	Lamb (2002)
Geral	525	30-35	60-90	30-60	4.2 (4.1-4.8)	
Lactação						
Vacas	138	25	45	20	6.5	Beal et al. (1992)
Vacas	138	25	65	40	8.0	Beal et al. (1992)
Vacas	223	29-33	54-61	~26	10.8	Stevenson et al. (2003)
Geral	361	25-33	45-65	20-40	8.8 (6.5-10.8)	

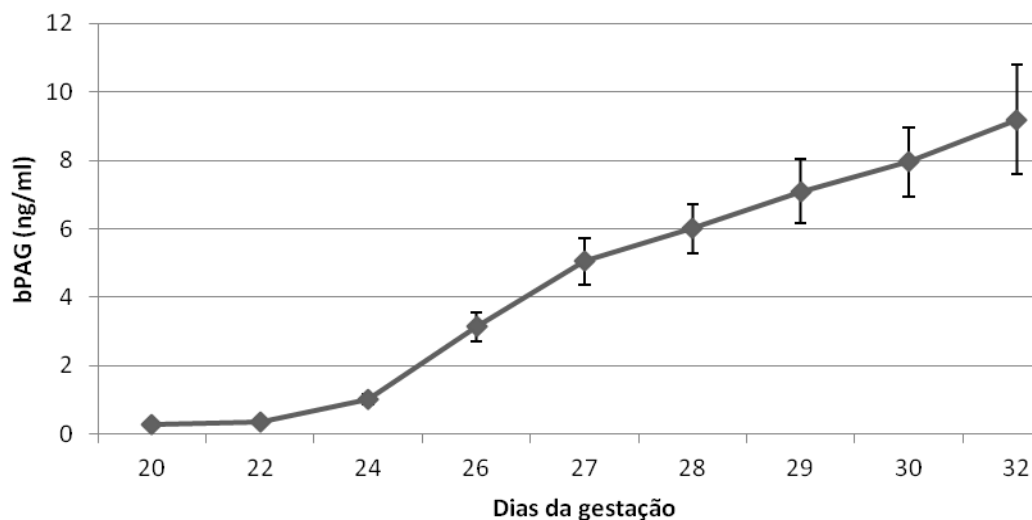


Figura 3. Concentração sérica de bPAGs desde o dia da inseminação artificial (dia 0) até o dia 32 da gestação. Primeiro aumento significativo ($P < 0.0001$) nas concentrações circulantes de bPAG ocorreu no dia 24 da gestação.

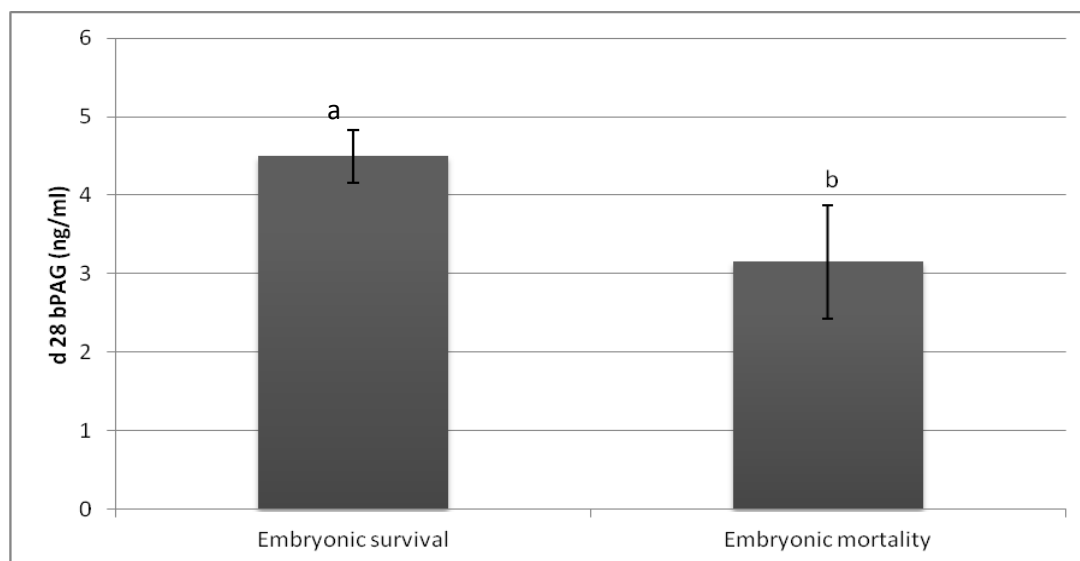


Figura 4. Concentrações séricas de bPAGs em vacas de corte pós-parto que tiveram um embrião viável no dia 28 ($n = 195$), e ou mantiveram a gestação (embryonic survival = sobrevivência embrionária; $n = 176$), ou que não mantiveram a gestação (embryonic mortality = mortalidade embrionária; $n = 19$). Vacas em que ocorreu mortalidade embrionária próximo ao dia 72 tiveram concentrações séricas de bPAGs mais baixas no dia 28 em comparação às vacas que mantiveram a gestação/embrião próximo ao dia 72 ($P < 0.05$).