

Função Uterina e Manutenção da Prenhez

G. A. Bridges^{*,1}, M. L. Day[†], T.W. Geary[‡], L. H. Cruppe[†]

^{*}North Central Research and Outreach Center, University of Minnesota, Grand Rapids 55744;

[†]Department of Animal Sciences, The Ohio State University, Columbus 43210; and

[‡]Fort Keogh Livestock and Range Research Laboratory, USDA-ARS, Miles City, MT 59301

INTRODUÇÃO

As taxas de fertilização são altas em bovinos e um dos principais fatores envolvidos na perda da prenhez é a deficiência uterina, que leva à morte embrionária. O estabelecimento e a manutenção da prenhez certamente dependem de uma função uterina adequada. Diferente do que ocorre em primatas e ratos, em bovinos a fixação do conceito e a placentação não ocorrem logo após a fertilização e o conceito passa um período prolongado de tempo no lúmen uterino, antes de se fixar ao endométrio (Bazer et al., 2009). Durante este período, o embrião depende do útero e das secreções uterinas para a obtenção de um microambiente adequado, que possibilite a progressão do seu desenvolvimento e sua eventual fixação (Bazer, 1975). A função uterina ideal requer alterações específicas e sequenciais da expressão gênica uterina (transcriptoma) para garantir que o endométrio produza as secreções necessárias e seja receptivo à aderência do conceito e à sua fixação e placentação. A progressão dos eventos obrigatórios para a sobrevivência e fixação do conceito dependem da coordenação e comunicação entre os esteróides ovarianos estradiol e progesterona, o endométrio e o conceito em fase de

alongamento. Infelizmente, a disfunção uterina ocorre em bovinos, sendo mais proeminente em certas populações. Em bovinos leiteiros e de corte, principalmente os animais que apresentam baixas concentrações de estradiol antes da ovulação e/ou que não apresentam elevação rápida da progesterona após a ovulação parecem ter disfunção uterina capaz de causar mortalidade embrionária. O objetivo desta revisão é discutir as causas das deficiências uterinas e explorar o mecanismo através do qual impedem o estabelecimento de prenhez em animais de produção, principalmente em bovinos.

CONTRIBUIÇÕES DO ÚTERO PARA A PERDA DA PRENHEZ EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO

Em bovinos, a perda da prenhez pode ser devida à falha na fertilização do ovócito ou à perda da prenhez durante a gestação. Embora taxas de prenhez bastante variadas tenham sido relatadas em bovinos de corte e leite, quando a inseminação é realizada no momento adequado em relação à ovulação, a falha na fertilização parece responder apenas por uma pequena parcela das perdas da prenhez. Em uma revisão antiga envolvendo bovinos de corte, Avalon (1978) relatou que a falha na fertilização ao primeiro serviço varia de 0,0 a 3,4% em novilhas e de 5,0 a 17,0% em vacas ciclando normalmente. Desde então, diversos estudos relataram taxas de fertilização entre 76 e 94% em bovinos de corte (Diskin e Sreenan, 1980; Smith et al., 1982; Maurer e Chenault, 1983; Ahmad et al., 1995). Em bovinos leiteiros, a falha na fertilização é um pouco mais elevada do que em bovinos de corte. Diversos estudos relataram taxas de fertilização entre 67 e 90%, em vacas lactantes e secas (Dejarnette et al., 1992; Dalton et al., 2001; Sartori et al., 2002; Cerri et al., 2009), exceto as que sofrem de estresse por calor (55,3%; Sartori et al., 2002). De forma geral, tais dados indicam que as taxas de fertilização de bovinos leiteiros e de corte são altas e provavelmente respondem apenas por uma pequena parcela das perdas da

prenhez.

Embora as taxas de prenhez sejam de aproximadamente 90% em vacas de corte e de 75 a 85% em vacas leiteiras, apenas 50 a 60% das vacas de corte e 30 a 40% das vacas leiteiras inseminadas após programas de sincronização de estro e/ou ovulação apresentam embriões viáveis aos 30 dias de gestação. Isso indica a ocorrência de perdas significativas de embriões em ambas as categorias animais. O momento exato da perda embrionária precoce e a proporção de gestações que falham devido à perda embrionária precoce variam muito entre relatos e a gravidade depende de inúmeros fatores, como idade, parição, estado de lactação, estresse e tipo de animal (de corte ou leite). Diversos fatores contribuem para a perda embrionária em animais de produção. Fatores como defeitos genéticos, doenças reprodutivas, saúde animal e estresse calórico de fato influenciam a sobrevivência do embrião. Além disso, uma proporção considerável de perdas ocorre antes da eclosão do blastocisto. Em vacas leiteiras, os embriões na fase de pré-eclosão encontram-se geralmente comprometidos, embora a proporção de embriões inviáveis coletados varie consideravelmente entre estudos (Sartori et al., 2010). Em um resumo de vários estudos (Sartori et al., 2010), a porcentagem de embriões inviáveis coletados entre o dia 5 e o dia 7 da gestação ficou entre 33,3 e 71,4%. A ovulação de ovócitos defeituosos e/ou a falta de suporte do oviduto suficiente ao embrião em desenvolvimento provavelmente contribuem para tais perdas. Embora a morte embrionária na fase pré-eclosão ou o comprometimento do desenvolvimento embrionário após a eclosão do blastocisto sejam altos em vacas de leite em lactação, perdas embrionárias adicionais que podem ser atribuídas à disfunção uterina ocorrem durante o alongamento e o período de fixação do conceito ao endométrio em bovinos. Além disso, em casos desprovidos de deficiência uterina, a transferência de um embrião de boa qualidade de 7 dias para uma receptora selecionada poderia aliviar as perdas

embrionárias, uma vez que a transferência de embriões evita os problemas relacionados às deficiências de fertilização, viabilidade do ovócito e função do oviduto. Infelizmente, perdas consideráveis de prenhez ainda se verificam em bovinos após a transferência de embriões. Por esse motivo, apesar da importância da maturação do ovócito e da função do oviduto, esta revisão será concentrada nos mecanismos envolvidos na perda da prenhez devido à disfunção uterina. As possíveis causas de deficiências uterinas incluem: 1) falha dos esteroides ovarianos em desencadear a regulação sequencial adequada de fatores endometriais, 2) alterações das populações de receptores esteroides e a supra e sub-regulação progressiva dos genes do endométrio, responsáveis pelo fornecimento de nutrientes e sinais para o conceito em desenvolvimento e pela preparação do endométrio para a recepção e fixação do conceito e 3) incapacidade do útero de responder a sinais embrionários relacionados ao reconhecimento materno da gestação ou de desencadear a produção de diversos produtos gênicos uterinos no momento adequado.

DINÂMICA ENDÓCRINA E UTERINA NECESSÁRIAS PARA O ESTABELECIMENTO DA PRENHEZ

A identificação das deficiências uterinas que resultam em morte embrionária requer a compreensão da progressão normal dos eventos necessários para o útero seja devidamente receptivo à implantação do conceito. A ovelha é o principal modelo animal empregado na investigação de fatores uterinos envolvidos no estabelecimento da prenhez. Entretanto, recentemente novas informações relacionadas à biologia uterina bovina foram disponibilizadas. Portanto, inferências relativas à biologia uterina da ovelha e da vaca serão usadas nesta revisão, apesar da existência de algumas diferenças entre as espécies. Além disso, a intenção desta revisão não é descrever detalhadamente as alterações dinâmicas que ocorrem no endométrio no

início da gestação e que são essenciais para o estabelecimento da prenhez. Tal assunto já foi revisado por Spencer et al. (2004) e Bazer et al. (2009). O objetivo desta revisão é fornecer uma breve sinopse dos eventos necessários para o estabelecimento de um ponto de partida para a identificação das deficiências uterinas.

Necessidades Hormonais para o Estabelecimento da Prenhez

A exposição sequencial à progesterona antes do estro, concentrações elevadas de estradiol no momento do estro e concentrações suficientes de progesterona no ciclo estral subsequente são necessárias para a obtenção de um ambiente uterino adequado à sobrevivência do conceito (Miller e Moore, 1976a,b, 1983; Moore, 1985; Wilmut et al., 1986). Durante o período pré-ovulatório, acredita-se que o estradiol “programe” o útero, preparando-o para receber o conceito através da modificação da morfologia celular, da preparação das organelas secretórias e da regulação da quantidade e da localização dos receptores esteroides.

Experimentos antigos realizados em ovelhas histerectomizadas (Miller e Moore, 1976a,b) determinaram a importância do estradiol pré-ovulatório na sobrevivência embrionária e na função uterina. Em ovelhas ovariectomizadas tratadas com esteroides, a supressão de concentrações de estradiol equivalentes às verificadas durante o estro levou à ausência de recuperação de embriões normais 21 dias após a transferência sincronizada (Miller e Moore, 1976a). A supressão do estradiol também reduziu o peso do útero, a taxa de síntese protéica uterina e a proporção de RNA total em relação ao DNA total no útero, em comparação com animais que receberam quantidades adequadas de estradiol (Miller e Moore, 1976b).

Recentemente, Roberts et al. (2012) demonstraram resultados semelhantes em vacas ovariectomizadas. A capacidade de manter a prenhez até o dia 21 foi semelhante em vacas ovariectomizadas que não receberam estradiol para simular o período pré-ovulatório e em vacas

que receberam cipionato ou benzoato de estradiol para simular a período pré-ovulatório; entretanto, as vacas que não receberam estradiol apresentaram queda da taxa de prenhez por volta do dia 29. Diversos estudos realizados em bovinos também associaram a quantidade de estradiol recebida durante o período pré-ovulatório à fertilidade subsequente. Uma relação positiva entre as concentrações de estradiol no momento da indução da ovulação e o sucesso da prenhez foi relatada em bovinos de leite e corte (Vasconcelos et al., 2001; Perry et al., 2005; Lopes et al., 2007). Vários outros relatos demonstraram que a ovulação induzida de folículos de tamanho inferior ao normal resulta na queda da taxa de prenhez em bovinos (Pohler et al., 2012). Dada a forte correlação entre o diâmetro folicular e a produção folicular de estradiol (Ireland e Roche, 1982; Kruij e Dieleman, 1985), é provável que, além do tamanho reduzido do folículo, a redução das concentrações pré-ovulatórias de estradiol tenham contribuído para a queda da fertilidade observada. É importante notar que o aumento do diâmetro do folículo ovulatório e das concentrações circulantes de estradiol antes da ovulação influenciam as concentrações de progesterona no ciclo estral subsequente (Vasconcelos et al., 2001; Perry et al., 2005; Bridges et al., 2010), o que também pode contribuir para a sobrevivência do embrião.

Do ponto de vista fisiológico, as concentrações mínimas de progesterona necessárias para a manutenção da prenhez não foram determinadas (Mann e Lamming, 1999), embora a manutenção de um corpo lúteo funcional seja fundamental para o sucesso da prenhez. Diversos estudos observacionais associaram as concentrações de progesterona no início da gestação a um maior desenvolvimento do embrião e do conceito em bovinos (Mann e Lamming, 2001; Green et al., 2005) e estudos adicionais demonstraram que a suplementação de progesterona no início da gestação (do dia 1 ao dia 9, por exemplo) acelera o crescimento do conceito e afeta as secreções uterinas (Garrett et al., 1988; Mann et al., 2006). Estudos realizados em vacas leiteiras

demonstraram uma associação positiva entre as concentrações de progesterona no início da gestação e a sobrevivência embrionária (McNeill et al., 2002; Stronge et al., 2005). Além disso, Kenyon et al. (2012) demonstraram que a alteração das concentrações de progesterona entre os dias 0 e 7 influencia os resultados da transferência de embriões nos dias 28, 42 e 63 da gestação, enquanto a alteração das concentrações de progesterona entre os dias 7 e 14 influencia os resultados nos dias 28 e 63 da gestação. Mais recentemente, Atkins et al. (2012) relataram que as concentrações de progesterona no momento da recuperação de embriões, no dia 7 após o estro, têm influência direta sobre o estágio de desenvolvimento embrionário. Em ovelhas ovariectomizadas tratadas com esteroides exógenos, a supressão da progesterona no início da gestação resultou em falha na recuperação de embriões, redução da síntese protéica uterina e redução da proporção uterina de RNA total em relação a DNA total no útero (Miller e Moore, 1976b). Sem dúvida, tanto concentrações elevadas de estradiol próximo à ovulação como concentrações adequadas de progesterona durante a gestação são necessárias para a sobrevivência do conceito e para a função uterina ideal em todas as espécies de animais de produção.

Embora uma associação entre o aumento das concentrações pré-ovulatórias de estradiol e das concentrações pós-ovulatórias de progesterona e a melhora de fertilidade tenha sido observada em bovinos, os estudos que relatam sucesso da prenhez após a suplementação de tais esteroides reprodutivos são discutíveis. Em vacas leiteiras em lactação, a administração de cipionato de estradiol (ECP) antes da inseminação artificial em tempo fixo foi associada a maior expressão de estro (Stevenson et al., 2004; Sellars et al., 2006). Embora a expressão do estro no momento da IA em tempo fixo possa melhorar as taxas de concepção (Pancarci et al., 2003; Kasimanickam et al., 2005; Souza et al., 2007), a administração de ECP não costuma melhorar as

taxas de prenhez por IA em tempo fixo em vacas leiteiras em lactação (Pancarci et al., 2002; Kasimanickam et al., 2005; Sellars et al., 2006; Hillegass et al., 2008). Em bovinos de corte, a administração de ECP antes da IA em tempo fixo aumenta a taxa de prenhez em vacas submetidas à indução da ovulação de folículos pequenos (Jinks et al., 2013). A melhora das taxas de prenhez através da suplementação direta de progesterona ou da indução da ovulação com hCG ou GnRH é variável. Embora alguns pesquisadores tenham observado melhora da fertilidade mediante suplementação de progesterona durante o desenvolvimento embrionário precoce, outros falharam em demonstrar efeitos benéficos (Mann e Lamming, 1999; Lamb et al., 2010; Wiltbank et al., 2012). Com base nas informações disponíveis, Mann e Lamming (1999) concluíram que a progesterona melhora as taxas de prenhez em 5%, mas que tal melhora depende dos dias de suplementação de progesterona e da fertilidade relativa dos rebanhos tratados. O motivo da discrepância entre os resultados de estudos observacionais que documentaram melhora da fertilidade em bovinos com concentrações elevadas de estradiol e progesterona e os resultados variáveis de fertilidade obtidos com a suplementação de esteróides não foi esclarecido. A duração da exposição, as diferenças entre as concentrações circulantes e as concentrações nos tecidos e órgãos alvo e o modo de administração podem contribuir para as respostas variáveis de fertilidade após a administração de esteróides exógenos. O estresse relacionado ao manuseio dos animais para a administração de progesterona suplementar também pode influenciar o sucesso do tratamento, conforme demonstrado por Geary et al. (2010), que relataram redução das taxas de prenhez após o manuseio de novilhas de corte durante o início da gestação (em torno do dia 13) para a administração do inibidor da prostaglandina F flunixin meglumine.

Regulação Ovariana dos Receptores Esteróides Endometriais

A compreensão adequada das comunicações entre o embrião e a placenta e das alterações endometriais complexas necessárias para a ocorrência e manutenção da prenhez em bovinos é fundamental para o desenvolvimento de medidas práticas voltadas para a melhora da eficiência reprodutiva. Avaliações recentes das alterações gênicas verificadas no endométrio bovino (Bauersachs et al., 2005, 2006; Klein et al., 2006; Mitko et al., 2008; Shimizu et al., 2010; Forde et al., 2011; Bauersachs e Wolf, 2012; Forde e Lonergan, 2012) demonstraram que a expressão gênica é temporariamente modulada pelas concentrações circulantes de progesterona e pela presença do conceito (embrião + tecidos placentários) e que tais alterações têm efeito direto sobre a capacidade uterina de sustentar o desenvolvimento embrionário e manter a prenhez. Em conjunto, tais avaliações da expressão gênica global impulsionaram a compreensão das alterações dinâmicas que ocorrem no endométrio bovino durante o ciclo estral e o início da gestação em resposta a diversos fatores endócrinos e sinais embrionários. Novas pesquisas podem partir desses estudos para elucidar os mecanismos através dos quais as alterações dos esteróides reprodutivos verificadas antes e depois da ovulação causam deficiências uterinas que culminam na morte do conceito.

A manutenção de ciclos estrais regulares e o estabelecimento de um ambiente uterino propício ao desenvolvimento do conceito dependem da expressão e localização dos receptores de progesterona (PGR), estradiol α (ESR1) e ocitocina (OXTR) no endométrio. O estradiol e a progesterona coordenam a expressão dessas populações de receptores (Kimmins e MacLaren, 2001; Meikle et al., 2001; Robinson et al., 2001; McNeill et al., 2006; Okumu et al., 2010). De uma forma simplificada, em bovinos, a elevação pré-ovulatória dos níveis de estradiol aumenta a expressão tanto de PGRs quanto de ESR1s no endométrio. Conforme o nível sérico de

progesterona aumenta durante a fase lútea subsequente, a expressão de ambos os tipos de receptores diminui, atingindo o menor quantidade no meio da fase lútea do ciclo estral. Informações de interesse foram publicadas por Okumu et al. (2010) e por Bridges et al. (2012), que observaram redução da expressão de PGRs no endométrio nos dias 13 e 15,5 do ciclo estral em vacas prenhes e vazias, respectivamente. Em vacas que estão ciclando, a redução da expressão de PGRs permite a elevação da expressão de OXTRs por volta do dia 16 do ciclo estral. Em fêmeas ruminantes prenhes, a secreção de interferon-tau (IFNT) pelo concepto em crescimento atenua o aumento da expressão de OXTRs, evitando a liberação subsequente de prostaglandina F2 α (PGF) pelo endométrio (Farin et al., 1990; Meyer et al., 1995). Em fêmeas ruminantes vazias, o aumento da expressão de OXTRs desencadeia o mecanismo luteolítico que resulta na liberação de PGF pelo útero, levando à luteólise e ao retorno ao estro (Silvia et al., 1991; McCracken et al., 1999).

Em fêmeas bovinas, ovinas e suínas prenhes, o desaparecimento dos PGRs do endométrio é um evento indispensável para a função uterina adequada durante a gestação. Entretanto, o grau de perda de PGRs nos diversos tipos celulares do endométrio varia entre espécies (Geisert et al., 1994; Spencer e Bazer, 1995; Spencer et al., 1999, 2004; Mathew et al., 2011). Em bovinos, não há PGRs no epitélio luminal durante a fase inicial da gestação, porém o grau de sub-regulação dos PGRs no epitélio glandular varia entre estudos, com relatos de desaparecimento completo (Robinson et al., 1999, 2001; Kimmins e MacLaren, 2001) ou presença de quantidades moderadas de PGR (Guzeloglu et al., 2004; Bilby et al., 2006; Cruppe, 2011; Bridges et al., 2012). Em todas as espécies domésticas de produção, a regulação temporal e espacial dos PGRs é fundamental para a expressão adequada de diversas proteínas e secreções endometriais durante a gestação (Spencer et al., 1999; Carson et al., 2000; Johnson et al., 2000; Satterfield et al., 2006;

Forde et al., 2009). A sub-regulação dos PGRs no epitélio glandular pode ser necessária para permitir a proliferação e diferenciação celular, podendo também resultar desses processos, que podem ser inibidos pela ação da progesterona através dos PGRs presentes no tecido em questão (Tong e Pollard, 1999). Embora a progesterona seja necessária para a indução das secreções uterinas, o desaparecimento dos PGRs é necessário para o aumento da secreção dos fatores uterinos necessários para o desenvolvimento do conceito, entre eles o histotrofo. O histotrofo uterino é composto por enzimas, citocinas, fatores de crescimento, íons, hormônios, glicose, frutose, aminoácidos, proteínas de transporte e moléculas de aderência (Bazer et al., 2012; Mullen et al., 2012). As secreções do epitélio glandular são fundamentais para o crescimento e a sobrevivência do conceito. Na ovelha, uma vez que não há PGRs nas células secretórias e a secreção é ditada pela progesterona, acredita-se que, durante o período pré-implantação e todo o restante da prenhez, a progesterona determine a secreção do histotrofo agindo através dos PGRs das células estromais do endométrio por meio da ação parácrina de “progestamedinas” possivelmente derivadas do estroma (Spencer e Bazer, 2002; Spencer et al., 2004). Embora tais progestamedinas ainda não tenham sido identificadas de forma definitiva, Spencer e Bazer (2002) sugeriram o fator de crescimento de fibroblastos-10, o fator de crescimento de fibroblastos-7, o fator de crescimento de hepatócitos, o Hoxa-10 e a molécula de sinalização Indian Hedgehog como possíveis candidatos.

DISFUNÇÃO UTERINA INDUZIDA POR FATORES ENDÓCRINOS

Conforme previamente indicado, fêmeas de corte ou leiteiras submetidas à indução da ovulação de folículos pequenos após a sincronização da ovulação e vacas leiteiras afetadas pelo catabolismo esteróide (Sangsrivong et al., 2002; Vasconcelos et al., 2003) apresentam perfis endócrinos defeituosos e baixa fertilidade (Lamb et al., 2001; Lucy et al., 2001; Perry et al.,

2005, 2007). Estudos prévios em vacas de corte (Mussard et al., 2003; Bridges et al., 2010, 2012; Atkins et al., 2012) e em vacas leiteiras em lactação (Sartori et al., 2006) indicaram que a função uterina deficiente contribui para o aumento das perdas de prenhez em animais com deficiência de esteróides. A informação não surpreende, dadas as inúmeras funções do estradiol e da progesterona na determinação do ambiente e da função uterina.

Papel das Concentrações Pré-ovulatórias de Estradiol sobre a Receptividade Uterina ao Concepto e a Sobrevivência do Concepto

Nos últimos anos, diversos estudos foram realizados em modelos animais com variação de estado funcional, diâmetro e idade do folículo à ovulação induzida (Mussard 2003a,b, 2007) e, mais tarde, em modelos animais com idade e diâmetro folicular constantes entre tratamentos, mas com alteração do intervalo de proestro e, subsequentemente, das concentrações pré-ovulatórias de estradiol (Figura 1; Bridges et al., 2010, 2012). A interpretação conjunta desses estudos encontra-se resumida na Tabela 1 e indica que: 1) a redução da fertilidade associada à ovulação de folículos “imaturos” é governada pela capacidade esteroidogênica do folículo durante o proestro e pelo corpo lúteo resultante, e não diretamente pelo diâmetro ou idade do folículo e 2) o ambiente hormonal esteroidal aberrante reduz a capacidade uterina de sustentar o embrião. Tal conclusão se baseia nos resultados do trabalho de Mussard et al. (2003b), em que o emprego da transferência de embriões em vez da IA continuou resultando em baixas taxas de prenhez em vacas com proestro curto.

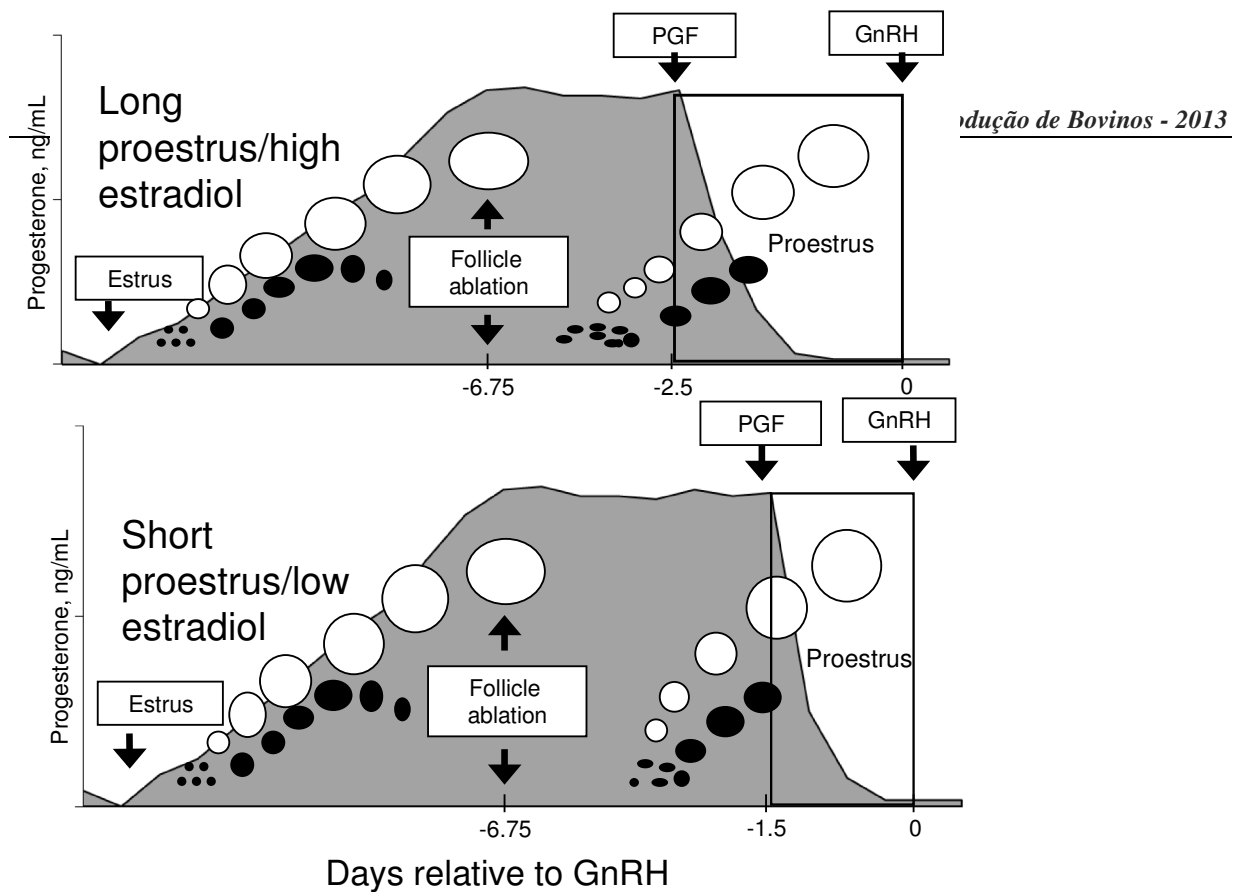


Figura 1. Modelo animal usado para a obtenção de tratamentos com variação da duração do proestro e das concentrações pré-ovulatórias de estradiol na série de experimentos citados. Os animais foram sincronizados para apresentar estro no mesmo dia antes da aspiração folicular ovariana. A aspiração folicular ovariana resultou na emergência de uma nova onda folicular 1 ou 2 dias depois. No tratamento proestro longo/estradiol alto, a PGF foi administrada aproximadamente 4 dias após a aspiração e o GnRH foi administrado 2,5 dias mais tarde. No tratamento proestro curto/estradiol baixo, a PGF foi administrada 5 dias após a emergência e o GnRH 1,5 dias mais tarde.

Pesquisas recentes envolvendo transferência de embriões de vacas com ovulação sem super estimulação (Atkins et al., 2012; Jinks et al., 2013) corroboram a hipótese de que a disfunção uterina seja responsável pela redução das taxas de prenhez em animais com baixas concentrações pré-ovulatórias de estradiol. Nesses estudos, um único embrião foi coletado de vacas submetidas à indução da ovulação de um folículo dominante pequeno com GnRH e transferido para vacas submetidas à indução da ovulação de folículos grandes ou pequenos. Analogamente, embriões de vacas submetidas à indução da ovulação de um folículo grande com GnRH foram transferidos para vacas submetidas à indução da ovulação de folículos grandes ou pequenos. A avaliação inicial mostrou que as concentrações séricas de estradiol das doadoras

contribuíram de forma significativa para a probabilidade de fertilização e que as concentrações de estradiol das receptoras no momento da indução da ovulação com GnRH foi um dos principais fatores de influência sobre a probabilidade de prenhez (Atkins et al., 2012). Em um estudo retrospectivo, Jinks et al. (2013) dividiram vacas doadoras e receptoras em dois grupos, de baixo estradiol ($< 8,4$ pg/mL) e alto estradiol ($\geq 8,4$ pg/mL), com base nas concentrações séricas de estradiol no momento da indução da ovulação. As taxas de fertilização foram mais altas nas vacas doadoras com concentrações séricas mais elevadas de estradiol no momento da indução da ovulação com GnRH. Entretanto, os resultados indicaram que as concentrações circulantes de estradiol das vacas receptoras no momento da indução da ovulação com GnRH permitiram a previsão do sucesso da prenhez aos 27 dias de gestação, mas não as das vacas doadoras. Tais resultados sugerem que a principal vantagem da presença de altas concentrações pré-ovulatórias de estradiol é a alteração do ambiente materno das vacas receptoras. Em outro estudo, Jinks et al. (2013) demonstraram que a administração de ECP 24 horas antes da IA aumenta as taxas de prenhez em vacas submetidas à indução da ovulação de um folículo dominante pequeno ($< 12,2$ mm). O ECP parece aumentar as concentrações de estradiol em vacas submetidas à indução da ovulação de folículos pequenos, melhorando a funcionalidade uterina e aumentando as taxas de prenhez. Em conjunto, tais estudos demonstram que a taxa de prenhez é menor em vacas com baixas concentrações de estradiol antes da ovulação e que a incapacidade o útero de sustentar o estabelecimento da prenhez é responsável pela queda da fertilidade.

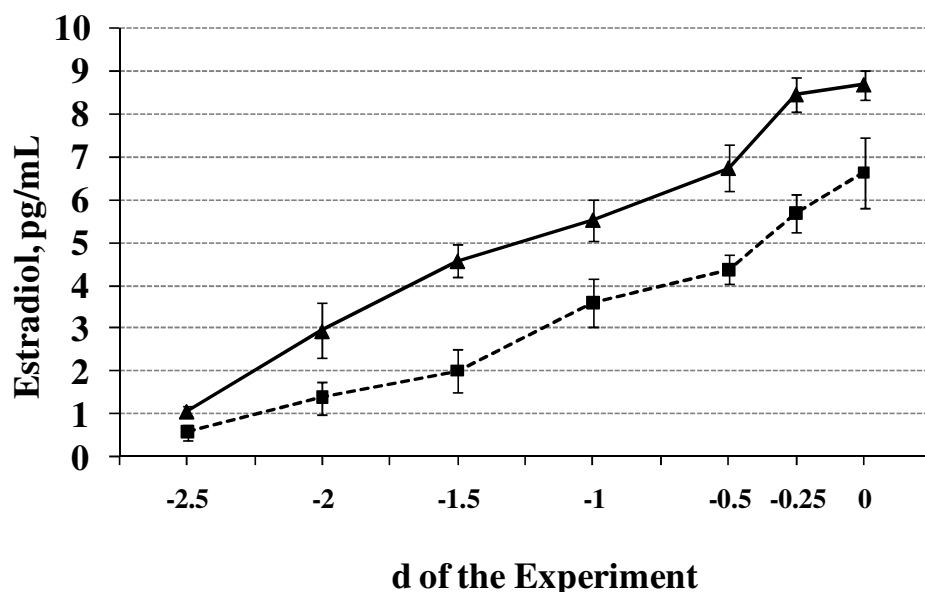


Figura 2. Concentrações circulantes de estradiol durante o período pré-ovulatório em novilhas manipuladas para apresentar concentrações pré-ovulatórias altas (HiE2; ▲) ou baixas (LoE2; ■) usando o modelo animal descrito na Figura 1 (Bridges et al., 2010). As novilhas receberam PGF no dia -2,5 (HiE2) ou no dia -1,5 (LoE2); todas as novilhas receberam GnRH no dia 0 para indução da ovulação [Tratamento, $P < 0,05$; interação tratamento x tempo, $P > 0,05$].

Experimentos anteriores empregando o modelo experimental ilustrado na Figura 1 demonstraram baixas taxas de prenhez aos 30 dias de gestação em vacas de corte com baixas concentrações pré-ovulatórias de estradiol (Bridges et al., 2010). Além disso, foi demonstrado que a manipulação das concentrações de estradiol antes da ovulação altera a expressão endometrial do OXTR e do gene da ciclo-oxigenase-2 no quinto dia do ciclo estral (Bridges et al., 2005). Tais resultados, assim como os previamente descritos, levaram Bridges et al. (2012) a investigar o efeito da alteração das concentrações pré-ovulatórias de estradiol sobre o desenvolvimento do conceito e a produção de IFNT, a estabilidade das concentrações uterinas de RNAm para receptores de esteroides e genes estimulados por IFN (ISG) e a localização dos

PGRs no endométrio. Novilhas de corte com concentrações pré-ovulatórias altas (HiE2) ou baixas (LoE2) de estradiol receberam um embrião 7 dias após a indução da ovulação (Figura 2). No dia 15,5 da gestação, as novilhas foram abatidas, os conceitos foram colhidos e o trato reprodutivo foi processado para futura avaliação imunohistoquímica e de RNAm. Conforme previamente demonstrado (Bridges et al., 2010; Cruppe et al., 2010; Souto et al., 2010), tal modelo experimental resultou em dois grupos de tratamento, com diferentes concentrações pré-ovulatórias de estradiol (Figura 2) e diâmetro semelhante do folículo ovulatório no momento da indução da ovulação com GnRH. As concentrações periféricas de progesterona no ciclo estral subsequente não diferiram entre os tratamentos de estradiol, mas se mostraram mais elevadas nas novilhas prenhes nos dias 4, 7 e 15,5 da gestação, independente do tratamento, com tendência à maior elevação no dia 6. Curiosamente, a concentração pré-ovulatória de estradiol não afetou o desenvolvimento do conceito, a produção de IFNT e a expressão de ISG. Entretanto, a intensidade de coloração dos PGRs (Figura 3) no epitélio glandular profundo e dos RNAm para ESR1 no endométrio foi maior nas novilhas com concentrações de estradiol elevadas. É possível que as altas concentrações pré-ovulatórias de estradiol tenham levado ao aumento da expressão de ESR1s e da quantidade de PGRs logo após a ovulação, características essas ainda evidentes no dia 15,5 do ciclo estral. Apesar das alterações específicas observadas no endométrio, a influência sobre o desenvolvimento do conceito, a produção de IFNT e a responsividade do endométrio aos sinais do conceito ainda não foi determinada. Tais achados e outros resultados de pesquisas prévias realizadas com o mesmo modelo animal (Bridges et al., 2010) indicam que as disfunções uterinas que levam à mortalidade embrionária em vacas com baixas concentrações pré-ovulatórias de estradiol se manifestam entre os dias 15,5 e 30 da gestação. Estudos subsequentes realizados por Cruppe (2011) e Souto (2011) empregando um modelo animal

semelhante, porém com avaliação dos conceitos e tecidos reprodutivos no dia 17,5 da gestação, também falharam em determinar a influência das concentrações pré-ovulatórias de estradiol sobre a função uterina e a sobrevivência do conceito. No dia 17,5 da gestação, uma tendência a produzir maiores quantidades de IFNT no lúmen uterino foi observada nos conceitos de vacas com altas concentrações pré-ovulatórias de estradiol, porém as concentrações pré-ovulatórias de estradiol não influenciaram outros indicadores da competência funcional do conceito (Souto, 2011). Crup (2011) avaliou a influência das concentrações pré-ovulatórias de estradiol sobre os níveis de várias proteínas e de RNAm no endométrio no dia 17,5 da gestação. As concentrações pré-ovulatórias de estradiol não influenciaram a expressão de ISG no endométrio. As quantidades relativas de RNAm para fosfoproteína secretada 1, uma proteína uterina associada à fixação do conceito em ovelhas (Johnson et al., 2003), variaram entre as replicações e, portanto, não houve associação com as diferentes concentrações pré-ovulatórias de estradiol. Entretanto, foram documentadas quantidades menores de PGRs no epitélio glandular profundo das vacas com altas concentrações de estradiol antes da ovulação, contrastando com dados relatados por Bridges et al. (2012). O motivo das diferenças na expressão de PGRs entre os dois estudos não foi esclarecido, mas é possível que a sub-regulação dos PGRs no epitélio glandular profundo entre os dias 15,5 e 17,5 seja necessária para que o útero possa sustentar o conceito em desenvolvimento.

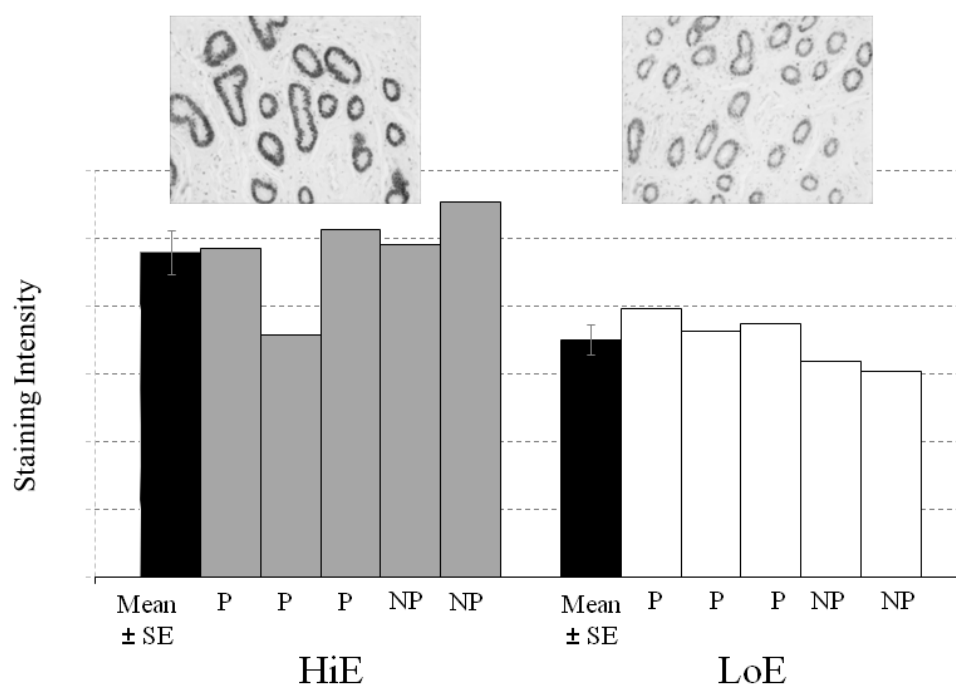


Figura 3. Receptor nuclear de progesterona no epitélio glandular profundo bovino no dia 15,5 do ciclo estral, em novilhas prenhas (P) e vazias (NP) submetidas à indução da ovulação de um folículo de tamanho semelhante após um proestro longo (2,5 dias), com elevação das concentrações pré-ovulatórias de estradiol (HiE), ou um proestro curto (1,5 dias), com redução das concentrações pré-ovulatórias de estradiol (LoE) (Bridges et al., 2012). As secções representativas das fêmeas de cada grupo de tratamento estão dispostas acima do respectivo tratamento. A intensidade da coloração diferiu entre os tratamentos, $P < 0,05$.

Embora a redução das concentrações pré-ovulatórias de estradiol sabidamente afete a fertilidade devido à alteração da capacidade uterina de sustentar o desenvolvimento do conceito, os estudos citados não foram capazes de identificar especificamente os genes ou proteínas endometriais responsáveis pelo ambiente uterino deficiente. Acredita-se que, na presença de concentrações pré-ovulatórias inadequadas de estradiol, apesar da ocorrência de diferenças marginais nas populações de receptores de esteroides uterinos, o desenvolvimento do conceito não seja inibido durante o período de reconhecimento materno da prenhez. Portanto, é provável que os efeitos negativos dos baixos níveis de estradiol sobre a função uterina ocorram em estágios posteriores à fixação do conceito. Tal hipótese é respaldada por dados adicionais: em vacas com proestro curto, o intervalo de retorno ao estro se prolongou até o dia 25, indicando que o embrião é capaz de se desenvolver durante o reconhecimento materno da prenhez, mas não sobrevive até o dia 30 da gestação (M. L. Mussard e M. L. Day, dados não publicados).

Além disso, em um estudo realizado por Roberts et al. (2012) em vacas ovariectomizadas tratadas e não tratadas com estradiol para simular o período pré-ovulatório até o dia 21 da gestação, não houve diferença na proporção de vacas com níveis elevados de ISGs na circulação (indicativos da presença do conceito), embora as vacas não tratadas tenham apresentado taxas de prenhez inferiores no dia 29. Vários outros relatos demonstraram que as concentrações pré-ovulatórias de estradiol podem ter efeitos de longo prazo sobre a expressão de diversos genes no endométrio (Ing et al., 2006; Schiefelbein et al., 2008; Perry et al., 2009). Portanto, novas pesquisas durante o período peri-implantação da gestação são necessárias para identificar de forma definitiva as disfunções uterinas específicas responsáveis pela morte do conceito em vacas que não apresentam concentrações pré-ovulatórias suficientes de estradiol.

Concentrações Luteais de Progesterona, Funcionalidade Uterina e Sobrevivência do Concepto

Acredita-se que a elevação das concentrações de progesterona durante a fase inicial da gestação facilite indiretamente o crescimento do conceito, acelerando a sub-regulação dos PGRs no endométrio e permitindo a secreção maior e mais precoce do histotrofo uterino através da suprarregulação de vias específicas de transporte de nutrientes (Forde et al., 2009, 2010). Na ovelha prenhe, a progesterona exógena aumenta as concentrações de vários aminoácidos (por exemplo, arginina, serina, glutamina e lisina) e tende a aumentar as concentrações de glicose no histotrofo uterino (Satterfield et al., 2010). Analogamente, a suplementação de progesterona no início da gestação aumenta a expressão endometrial de diversos genes associados à produção do histotrofo ou de componentes que aceleram o desenvolvimento do conceito em vacas (Forde et al., 2009, 2011).

Mais pertinente ao objetivo deste artigo é o efeito da redução das concentrações de progesterona circulante sobre a função uterina e o desenvolvimento do conceito. Conforme descrição anterior, certas populações de vacas de corte e leite apresentam baixas concentrações de progesterona no início da gestação. Assim como altas concentrações de progesterona no início da gestação levam a maior desenvolvimento do conceito, concentrações baixas de progesterona reduzem o crescimento do conceito e a secreção IFNT, podendo afetar o reconhecimento materno da prenhez (Mann e Lamming, 2001; Mann et al., 2006). Atkins et al. (2012) recentemente demonstraram que, em vacas de corte receptoras, a concentração de progesterona no momento da transferência realizada no dia 7 é a variável que melhor estima a probabilidade de sucesso da prenhez aos 27 dias de gestação. Além disso, de acordo com diversos estudos observacionais, as concentrações de progesterona são mais baixas em vacas vazias do que em vacas prenhes ao diagnóstico de gestação (Lukaszewska e Hansel, 1980; Shelton et al., 1990;

Mann et al., 1995; Kerbler et al., 1997; Perry et al., 2005; Mann e Lamming, 2001; Hommeida et al., 2004). Trata-se de uma resposta associativa, porém que respalda a hipótese de que a redução dos níveis de progesterona durante a fase inicial da gestação seja deletéria para a fertilidade.

A avaliação mais abrangente dos efeitos de baixas concentrações circulantes de progesterona sobre as alterações do transcriptoma uterino, o padrão temporal de expressão gênica endometrial e o desenvolvimento do conceito em bovinos foi publicada recentemente por Forde et al. (2011) e (2012). Usando um modelo animal específico, tais pesquisadores conseguiram reduzir as concentrações circulantes de progesterona e comparar as alterações verificadas no útero e no conceito com as observadas em novilhas com padrões normais de secreção de progesterona. As novilhas com concentrações baixas e normais de progesterona após a ovulação diferiram quanto à expressão de 498 genes no dia 7 e de 351 genes no dia 13 do ciclo estral (Forde et al., 2012). A redução da concentração de progesterona resultou no atraso da sub-regulação dos PGRs no epitélio glandular e luminal (Forde et al., 2011). A redução da concentração de progesterona, somada à alteração da regulação temporal dos PGRs em novilhas com baixas concentrações de progesterona, alterou a expressão temporal de diversos genes associados à composição do histotrofo, à seleção de transportadores, à proliferação e migração celular e ao remodelamento proteico, além de genes possivelmente envolvidos no alongamento do conceito (Forde et al., 2011, 2012). Foi demonstrado que a alteração da função uterina por baixas concentrações circulantes de progesterona atrasa o crescimento do conceito após a transferência do embrião (Forde et al., 2011). A comparação com avaliações prévias de novilhas com altas concentrações de progesterona após a ovulação (Forde et al., 2011) indicou que os genes alterados por baixas concentrações de progesterona diferem dos afetados por altos níveis de progesterona (Forde et al., 2012). De uma forma geral, as baixas concentrações de

progesterona desencadeiam alterações no transcriptoma uterino que resultam em disfunção uterina, com incapacidade de sustentar o alongamento do conceito.

RESUMO E CONCLUSÕES

Embora diversos fatores (Atkins et al., 2012) influenciem a sobrevivência do embrião, inclusive as características foliculares descritas por Geary et al. (2012), é evidente que as deficiências uterinas contribuem muito para a infertilidade em bovinos. Esta revisão aborda principalmente o papel dos esteróides ovarianos no estabelecimento de uma função uterina adequada para sustentar o crescimento e a implantação do conceito e os efeitos deletérios das deficiências pré-ovulatórias de estradiol e pós-ovulatórias de progesterona sobre o microambiente uterino, que resultam na morte do conceito. Embora baixas concentrações pré-ovulatórias de estradiol sabidamente causem deficiências uterinas capazes de impedir a manutenção da prenhez, a alteração endometrial específica responsável pela deficiência funcional uterina ainda não foi identificada. Recentemente, as deficiências uterinas causadas por baixas concentrações pós-ovulatórias de progesterona foram parcialmente definidas. A queda da concentração de progesterona no início da gestação altera a regulação normal dos PGRs e resulta em diversas alterações do transcriptoma endometrial, mais especificamente dos genes envolvidos na produção e composição do histotrofo e na preparação do útero para a fixação do conceito. Tais alterações resultam no atraso do desenvolvimento do conceito e, em muitos casos, na sua morte. Do ponto de vista prático, os técnicos devem estar cientes das possíveis deficiências uterinas induzidas pelas alterações das concentrações de esteróides reprodutivos ao desenvolver e implementar tecnologias e estratégias de manejo reprodutivo em bovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, N., F. N. Schrick, R. L. Butcher, and E. K. Inskeep. 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. Reprod.* 52:1129-1135.
- Atkins, J. A., M. F. Smith, K. J. Wells, and T. W. Geary. 2010a. Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate after gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part I: Cycling Cows. *J. Anim. Sci.* 88:2300-2310.
- 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 Cows. *J. Anim. Sci.* 88:2311-2320.
- Atkins, J. A., M. F. Smith, M. D. MacNeil, E. M. Jinks, F. M. Abreu, L. J. Alexander, and T. W. Geary. 2012. Pregnancy establishment and maintenance in cattle. *J. Anim. Sci.* 91: [Epub ahead of print November 12, 2012] doi: 10.2527/jas.2012-5368.
- Ayalon, N. 1978. A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 54:483-493.
- Bartol, F. F., A. A. Wiley, J. G. Floyd, T. L. Ott, F. W. Bazer, C. A. Gray, and T. E. Spencer. 1999. Uterine differentiation as a foundation for subsequent fertility. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54:287-302.
- Bauersachs, S., S. E. Ulbrich, K. Gross, S. E. M. Schmidt, H. H. D. Meyer, R. Einspanier, H. Wenigerkind, M. Vermehren, H. Blum, F. Sinowatz, and E. Wolf. 2005. Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. *J. Mol. Endocrinol.* 34:889-908.
- Bauersachs, S., S. E. Ulbrich, K. Gross, S. E. M. Schmidt, H. H. D. Meyer, H. Wenigerkind, M. Vernehen, F. Sinowatz, H. Blum, and E. Wolf. 2006. Embryo-induced transcriptome

- changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction* 132:319-331.
- Bauersachs, S., and E. Wolf. 2012. Transcriptome analyses of bovine, porcine and equine endometrium during the pre-implantation phase. *Anim. Reprod. Sci.* 134:84-94.
- Bazer, T.W. 1975. Uterine protein secretions: relationship to development of the conceptus. *J. Anim. Sci.* 41:1376-1382.
- Bazer, T. W., T. E. Spencer, G. A. Johnson, R. C. Burghardt, and G. Wu. 2009. Comparative aspects of implantation. *Reproduction* 138:195-209.
- Bazer, F. W., G. Wu, T. E. Spencer, G. A. Johnson, R. C. Burghardt, and K. Bayless. 2010. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol. Human Reprod.* 16:135-152.
- Bazer, F. W., G. Song, J. Kim, D. W. Erikson, G. A. Johnson, R. C. Burghardt, H. Gao, M. C. Satterfield, T. E. Spencer, and G. Wu. 2012. Mechanistic mammalian target of rapamycin (MTOR) cell signaling: Effects of select nutrients and secreted phosphoprotein 1 on development of mammalian conceptuses. *Mol. Cell. Endocrinol.* 354:22-33.
- Bilby, T. R., A. Guzeloglu, L. A. MacLaren, C. R. Staples, and W. W. Thatcher. 2006. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: II. Endometrial gene expression related to maintenance of pregnancy. *J. Dairy Sci.* 89:3375-3385.
- Bridges, G. A., M. L. Mussard, J. L. Winkler, C. L. Gasser, D. E. Grumm, J. L. Pate, and M. L. Day. 2005. Influence of duration of proestrus on preovulatory estradiol concentrations and uterine gene expression following induced ovulation in cattle. *Proceedings of the 38th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (Abstr. M451).*

- 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.
- Bridges G. A, M. L. Mussard, J. L. Pate, T. L. Ott, T. R. Hansen, and M. L. Day. 2012. Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. *Anim. Reprod. Sci.* 133:16-26.
- Carson, D. D., I. Bagchi, S. K. Dey, A. C. Enders, A. T. Fazleas, B. A. Lessey, and K. Yoshinaga. 2000. Embryo implantation. *Develop. Biol.* 223:217-237.
- Cerri, R. L. A., S. O. Juchem, R. C. Chebel, H. M. Rutigliano, R. G. S. Bruno, K. N. Galvão, W. W. Thatcher, and J. E. P. Santos. 2009. Effects of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:1520-1531.
- Cruppe, L. H. 2011. The effect of preovulatory concentrations of estradiol and length of proestrus on fertility in beef cattle. MS Thesis. The Ohio State Univ., Columbus.
- Dalton, J. C., S. Nadir, J. H. Bame, M. Noftsinger, R. L. Nebel, and R. G. Saacke. 2001. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 84:2413-2418.
- DeJarnette, J. M., R. G. Saacke, J. Bame, and C. J. Vogler. 1992. Accessory sperm: Their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. *J. Anim. Sci.* 70:484-491.
- Diskin, M. G., and J. M. Sreenan. 1980. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J. Reprod. Fertil.* 59:463-468.
- Farin, C. E., K. Imakawa, T. R. Hansen, J. J. McDonnell, C. N. Murphy, P. W. Farin, and R. M.

- Roberts. 1990. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biol. Reprod.* 43:210-218.
- Flint, A. P., H. J. Stewart, G. E. Lamming, and J. H. Payne. 1992. Role of the oxytocin receptor in the choice between cyclicity and gestation in ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 45:53-58.
- Forde, N., F. Carter, T. Fair, M. A. Crowe, A. C. O. Evans, T. E. Spencer, T. W. Bazer, R. McBride, M. P. Boland, P. O’Gaora, P. Lonergan, and J. F. Roche. 2009. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol. Reprod.* 81:784-794.
- Forde, N., T. E. Spencer, F. W. Bazer, G. Song, J. F. Roche, and P. Lonergan. 2010. Effect of pregnancy and progesterone concentrations on expression of genes encoding for transporters or secreted proteins in the bovine endometrium. *Physiol. Genomics* 41:53-62.
- Forde, N., M. E. Beltman, G. B. Duffy, P. Duffy, J. P. Mehta, P. O’Gaora, J. F. Roche, P. Lonergan, and M. A. Crowe. 2011. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: Effect of low circulating concentrations of progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biol. Reprod.* 84:266-278.
- Forde, N., J. P. Mehta, M. Minten, M. A. Crowe, J. F. Roche, T. E. Spencer, and P. Lonergan. 2012. Effects of low progesterone on the endometrial transcriptome in cattle. *Biol. Reprod.* 87:1-11.
- Forde, N., and P. Lonergan. 2012. Transcriptomic analysis of the bovine endometrium: what is required to establish uterine receptivity to implantation in cattle? *J. Reprod. Dev.* 58:189-195.
- Geary, T. W., R. P. Ansotegui, M. D. MacNeil, A. J. Roberts, and R. C. Waterman. 2010.

- Effects of flunixin meglumine on pregnancy establishment in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 88:943-949.
- Geary, T. W., M. F. Smith, M. D. MacNeil, M. L. Day, G. A. Bridges, G. A. Perry, F. M. Abreu, J. A. Atkins, K. G. Pohler, E. M. Jinks, and C. A. Madsen. 2012. Influence of follicular characteristics at ovulation on early embryo survival. *J. Anim. Sci.* 91: [Epub ahead of print December 10, 2012] doi: 10.2527/jas.2012-5887.
- Geisert, R. D., T. N. Pratt, F. W. Bazer, J. S. Mayes, and G. H. Watson. 2004. Immunocytochemical localization and changes in endometrial progesterin receptor protein during the porcine estrous cycle and early pregnancy. *Reprod. Fertil. Dev.* 6:749-760.
- Gray, C. A., F. F. Bartol, K. M. Taylor, A. A. Wiley, W. S. Ramsey, T. L. Ott, F. W. Bazer, and T. E. Spencer. 2000. Ovine uterine gland knock-out model: effects of gland ablation on the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 62:448-456.
- Gray, C. A., K. M. Taylor, W. S. Ramsey, J. R. Hill, F. W. Bazer, F. F. Bartol, and T. E. Spencer. 2001. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biol. Reprod.* 64:1608-1613.
- Gray, C. A., R. C. Burghardt, G. A. Johnson, F. W. Bazer, and T. E. Spencer. 2002. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction* 124:289-300.
- Green, M. P., M. G. Hunter, and G. E. Mann. 2005. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 88:179-189.
- Guzeloglu, A., T. R. Bilby, A. Meikle, S. Kamimura, A. Kowalski, F. Michel, L. A. MacLaren, and W. W. Thatcher. 2004. Pregnancy and bovine somatotropin in nonlactating dairy

- cows: II. Endometrial gene expression related to maintenance of pregnancy. *J. Dairy Sci.* 87:3268-3279.
- Hillegass, J., F. S. Lima, M. F. Sá Filho, and J. E. P. Santos. 2008. Effect of time of artificial insemination and supplemental estradiol on reproduction of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:4226-4237.
- Hommeida, A., T. Nakao, and H. Kubota. 2004. Luteal function and conception in lactating cows and some factors influencing luteal function after first insemination. *Theriogenology* 62:217-225.
- Ing N. H., T. E. Spencer, and F. W. Bazer. 1996. Estrogen enhances endometrial estrogen receptor gene expression by a posttranscriptional mechanism in the ovariectomized ewe. *Biol. Reprod.* 54:591-599.
- Ing, N. and Y. Zhang. 2004. Cell-specific expression of estrogen-responsive genes in the uteri of cyclic, early pregnant and ovariectomized ewes. *Theriogenology* 62:403-414.
- Ing, N. H., R. L. Wolfskill, S. Clark, J. A. DeGrauw, and C. A. Gill. 2006. Steroid hormones acutely regulate expression of a nudix protein-encoding gene in the endometrial epithelium of sheep. *Mol. Reprod. Dev.* 73:967-976.
- Ireland, J. J. and J. F. Roche. 1982. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology* 111:2077-2086.
- Jinks, E. M., M. F. Smith, J. A. Atkins, K. G. Pohler, G. A. Perry, M. D. MacNeil, A. J. Roberts, R. C. Waterman, L. J. Alexander, and T. W. Geary. 2013. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 91: (Accepted) doi:10.2527/jas.2012-5611.

- Johnson, G. A., T. E. Spencer, R. C. Burghardt, K. M. Taylor, C. A. Gray, and F. W. Bazer. 2000. Progesterone modulation of osteopontin gene expression in the ovine uterus. *Biol. Reprod.* 62:1315-1321.
- Johnson, G. A., R. C. Burghardt, F. W. Bazer, and T. E. Spencer. 2003. Osteopontin: Roles in implantation and placentation. *Biol. Reprod.* 69:1458-1471.
- Kasimanickam, R., J. M. Cornwell, and R. L. Nebel. 2005. Fertility following fixed-time AI or insemination at observed estrus in Ovsynch and Heatsynch programs in lactating dairy cows. *Theriogenology* 63:2550-2559.
- Kerbler, T. L., M. M. Buhr, L. T. Jordan, K. E. Leslie, and J. S. Walton. 1997. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 47:703-714.
- Kenyon, A. G., L. G. D. Mendonca, G. Lopes Jr., J. R. Lima, J. E. P. Santos, and R. C. Chebel. 2012. Minimal progesterone concentration required for embryo survival after embryo transfer in lactating Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.* [Epub ahead of print October 29, 2012] doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.10.014.
- Kimmins, S., and L. A. MacLaren. 2001. Oestrous cycle pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* 22:742-748.
- Lukaszewska J. and W. Hansel. 1980. Corpus luteum maintenance during early pregnancy in the cow. *J. Reprod Fertil.* 59:485-493.
- Klein, C., S. Bauersachs, S. E. Ulbrich, R. Einspanier, H. H. D. Meyer, S. E. M. Schmidt, H. D. Reichenbach, M. Vermehren, F. Sinowatz, H. Blum, and E. Wolf. 2006. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the preattachment period. *Biol. Reprod.* 74:253-264.

- Kruip, T. A., and S. J. Dieleman. 1985. Steroid hormone concentrations in the fluid of bovine follicles relative to size, quality and stage of the oestrus cycle. *Theriogenology* 24:395-408.
- Lamb, G. C., J. S. Stevenson, D. J. Kesler, H. A. Garverick, D. R. Broan, and B. E. Salfen. 2001. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F_{2α} for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 79:2253-2259.
- Lamb, G. C., C. R. Dahlen, J. E. Lason, G. Marquezini, and J. S. Stevenson. 2010. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 88(E-Suppl.):E181-E192.
- Lopes, A. S., S. T. Butler, R. O. Gilbert, and W. R. Butler. 2007. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 99:34-43.
- Lucy, M. C. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci.* 84:1277-1293.
- Lukaszewska J. and W. Hansel. 1980. Corpus luteum maintenance during early pregnancy in the cow. *J. Reprod Fertil.* 59:485-493.
- Mann, G. E., G. E. Lamming, and M. D. Fray. 1995. **Plasma oestradiol and progesterone during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin.** **Anim. Reprod. Sci.** 37:121-131.
- Mann, G. E. and G. E. Lamming. 1999. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 34:269-274.
- Mann, G. E. and G. E. Lamming. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reprod.*

121:175-180.

- Mann, G. E., M. D. Fray, and G. E. Lamming. 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. *Vet. J.* 171:500-503.
- Maurer, R. R. and J. R. Chenault. 1983. Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonparous beef cattle. *J. Anim. Sci.* 56:1186-1189.
- Mathew, D. J., E. M. Sellner, J. C. Green, C. S. Okamura, L. L. Anderson, M. C. Lucy, R. D. Geisert. 2011. Uterine progesterone receptor expression, conceptus development, and ovarian function in pigs treated with RU 486 during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 84:130-139.
- McCracken, J. A., E. E. Custer, and J. C. Lamsa. 1999. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 79:263-324.
- McNeill, R. E., M. G. Diskin, J. M. Sreenan, and D. G. Morris. 2006. Associations between milk progesterone concentrations on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology* 65:1435-1441.
- Meikle, A., L. Sahlin, A. Ferraris, B. Masironi, J. E. Blanc, M. Rodriguez-Irazoqui, M. Rodriguez-Pinon, H. Kindahl, and M. Forsberg. 2001. Endometrial mRNA expression of oestrogen receptor α , progesterone receptor and insulin-like growth factor-I (IGF-I) throughout the bovine oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 68:45-56.
- Meyer, M. D., G. D. Desnoyers, B. Oldick, W. W. Thatcher, M. Drost, T. K. Schalue, and R. M. Roberts. 1996. Treatment with recombinant bovine interferon- τ in utero attenuates secretion of prostaglandin F from cultured endometrial epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 79:1375-1384.
- Miller, B. G. and N. W. Moore. 1976a. Effects of progesterone and oestradiol on endometrial

- metabolism and embryo survival in the ovariectomized ewe. *J. Reprod. Fertil.* 46:535-536.
- Miller, B. G. and N. W. Moore. 1976b. Progesterone and oestrogen requirements for the survival of embryos in the ovariectomized ewe. *J. Reprod. Fertil.* 46:536-537.
- Miller, B. G., and N. W. Moore. 1983. Endometrial protein secretion during early pregnancy in entire and ovariectomized ewes. *Reprod. Fertil.* 68:137-144.
- Mitko, K., S. E. Ulbrich, H. Wenigerkind, F. Sinowatz, H. Blum, E. Wolf, and S. Bauersachs. 2008. Dynamic changes in messenger RNA profiles of bovine endometrium during the estrous cycle. *Reproduction* 135:225-240.
- Moore, N. W., 1985. The use of embryo transfer and steroid hormone replacement therapy in the study of prenatal mortality. *Theriogenology* 23:121-129.
- Mullen, M., G. Elia, M. Hilliard, M. H. Parr, M. G. Diskin, A. C. O. Evans, and M. A. Crow. 2012. Proteomic characterization of histotroph during the preimplantation phase of the estrous cycle in cattle. *J. Proteome Res.* 11:3004-3018.
- Mussard, M. L., C. R. Burke, E. J. Behlke, C. L. Gasser, A. R. Robison, J. E. Kinder, and M. L. Day. 2002. Influence of premature induction of an LH surge with GnRH on ovulation, luteal function and fertility in cattle. *Biol. Reprod.* 66:(Suppl. 1):266. (Abstr.)
- Mussard, M. L., C. R. Burke, and M. L. Day. 2003a. Ovarian follicle maturity at induced ovulation influences fertility in cattle. Pages 179-185 in *Proc. Ann. Conf. Soc. Theriogenol.*, Columbus, OH.
- Mussard, M. L., C. R. Burke, C. L. Gasser, E. J. Behlke, K. A. Colliflower, D. E. Grum, and M. L. Day. 2003b. Ovulatory response, luteal function and fertility in cattle induced to ovulate dominant follicles of early or late maturity. *Biol. Reprod.* 68(Suppl. 1):332.

(Abstr.)

- Mussard, M. L., C. R. Burke, E. J. Behlke, C. L. Gasser, and M. L. Day. 2007. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function and fertility in cattle. *J. Anim. Sci.* 85:937-943.
- Okumu, L. A., N. Forde, A. G. Fahey, E. Fitzpatrick, J. F. Roche, M. A. Crowe, and P. Lonergan. 2010. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localization of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *Reproduction* 140:143-153.
- Pancarci, S. M. E. R. Jordan, C. A. Risco, M. J. Schouten, F. L. Lopes, F. Moreira, and W. W. Thatcher. 2002. Use of estradiol cypionate in a presynchronized time artificial insemination program for lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:122-131.
- Perry, G. A., M. F. Smith, M. C. Lucy, J. A. Green, T. E. Parks, M. D. MacNeil, A. J. Roberts, and T. W. Geary. 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5268-5273.
- Perry, G. A., M. F. Smith, A. J. Roberts, M. D. MacNeil, and T. W. Geary. 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 85:684-689.
- Perry, G. A., B. L. Perry, and R. A. Cushman. 2009. Association between preovulatory concentrations of estradiol and expression of uterine milk protein precursor, inhibin beta A, period 1, proenkephalin, and receptors for oxytocin, progesterone, and estradiol. *Biol. Reprod.* 79 (Suppl. 1). 308. (Abstr.)

- Pohler, K. G., T. W. Geary, J. A. Atkins, G. A. Perry, E. M. Jinks, and M. F. Smith. 2012. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. *Cell. Tissue Res.* 349:649-664.
- Roberts, C. A., G. A., Perry, M. D. MacNeil, M. A. Minten, and T. W. Geary. 2012. Effects of preovulatory estradiol concentrations on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. *J. Anim. Sci.* 90 (Suppl. 3):155. (Abstr.)
- Robinson, R. S., G. E. Mann, G. E. Lamming, and D. C. Wathes. 1999. The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. *J. Endocrinol.* 160:21-33.
- Robinson, R. S., G. E. Mann, G. E. Lamming, and D. C. Wathes. 2001. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction* 122:965-979.
- Sangsrivong, S., D. K. Combs, R. Sartori, L. E. Armentano, and M. C. Wiltbank. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:2831-2842.
- Sartori, R., R. Sartor-Bergfelt, S. A. Mertens, J. N. Guenther, J. J. Parish, and M. C. Wiltbank. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.* 85:2803-2812.
- Sartori, R., A. Gumen, J. N. Guenther, A. H. Souza, D. X. Caraviello, and M. C. Wiltbank. 2006. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology* 65:1311-1321.
- Sartori, R., M. R. Bastos, and M. C. Wiltbank. 2010. Factors affecting fertilization and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 22:151-158.

- Satterfield, M. C., F. W. Bazer, and T. E. Spencer. 2006. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biol. Reprod.* 75:289-296.
- Satterfield, M. C., K. A. Dunlap, K. Hayashi, R. C. Burghardt, T. E. Spencer, and F. W. Bazer. Tight and adherens junctions in the ovine uterus: differential regulation by pregnancy and progesterone. *Endocrinology* 148:3922-3931.
- Satterfield, M. C., H. Gao, X. Li, G. Wu, G. A. Johnson, T. E. Spencer, and F. W. Bazer. 2010. Select nutrients and their associated transporters are increased in the ovine uterus following early progesterone administration. *Biol. Reprod.* 82:224-231.
- Schiefelbein, A. K., B. L. Perry, and G. A. Perry. 2008. Association between preovulatory concentrations of estradiol and expression of uterine receptors for oxytocin, progesterone, and estradiol. *Biol. Reprod.* 78 (Suppl. 1):362. (Abstr.)
- Sellars, C. B., J. C. Dalton, R. Manzo, J. Day, and A. Ahmadzadeh. 2006. Time and incidence of ovulation and conception rates after incorporating estradiol cypionate into a timed artificial insemination protocol. *J. Dairy Sci.* 89:620-626.
- Shelton, K., M. F. Gayerie de Abreu, M. G. Hunter, T. J. Parkinson, and G. E. Lamming. 1990. Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. *J. Reprod. Fertil.* 90:1-10.
- Shimizu, T., S. Krebs, S. Bauersachs, H. Blum, E. Wolf, and A. Miyamoto. 2010. Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium. *Physiol. Genomics* 42:290-300.
- Silvia, W. J., G. S. Lewis, J. A. McCracken, W. W. Thatcher, and L. Wilson Jr. 1991. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ during luteolysis in

- ruminants. *Biol. Reprod.* 45:655-663.
- Smith, M. F., K. J. Nix, D. C. Kraemer, M. S. Amoss, M. A. Herron, and J. N. Wiltbank. 1982. Fertilization rate and early embryonic loss in Brahman crossbred heifers. *J. Anim Sci.* 54:1005-1011.
- Souto, L. A. 2011. The effect of length of the preovulatory period on mechanisms regulating embryonic survival in beef cattle. MS Thesis. The Ohio State Univ., Columbus.
- Souza, A. H., A. Gumen, E. P. B. Silva, A. P. Cunha, J. M. Guenther, C. M. Peto, D. Z. Caraviello, and M. C. Wiltbank. 2007. Supplementation with estradiol-17 β before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:4623-4634.
- Spencer, T. E., and F. W. Bazer. 1995. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol. Reprod.* 53:1527-1543.
- Spencer, T. E., and F. W. Bazer. 1996. Ovine interferon tau suppression transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology* 137:1144-1147.
- Spencer, T. E., and F. W. Bazer. 2002. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front. Biosci.* 7:d1879-d1898.
- Spencer, T. E., G. A. Johnson, F. W. Bazer, and R. C. Burghardt. 2004. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 128:657-668.
- Stevenson, J. S., S. M. Tiffany, and M. C. Lucy. 2004. Use of estradiol cypionate as a substitute for GnRH in protocols for synchronizing ovulation in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 87:3298-3305.

Stronge, A. J., J. M. Sreenan, M. E. Diskin, J. F. Mee, D. A. Kenny, and D. G. Morris. 2005.

Post-insemination milk progesterone concentrations and embryo survival in dairy cows.

Theriogenology 64:1212-1224.

Tong, W., and J. W. Pollard. 1999. Progesterone inhibits estrogen-induced cyclin D1 and cdk4

nuclear translocation, cyclin E- and cclinA-cdk2 kinase activation, and cell proliferation

in uterine epithelial cells in mice. Mol. Cell. Biol. 19:2251-2264.

Vasconcelos, J. L. M., R. Sartori, H. N. Oliveira, J. G. Guenther, and M. C. Wiltbank. 2001.

Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy

rate. Theriogenology 56:307-314.

Vasconcelos, J. L., S. Sangritavong, S. J. Tsai, and M. C. Wiltbank. 2003. Acute reduction in

serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. Theriogenology

60:795-807.

Wilmut, I., D. I. Sales, and C. J. Ashworth. 1986. Maternal and embryonic factors associated

with prenatal loss in mammals. J. Reprod. Fertil. 76:851-864.

Wiltbank, M. C., A. H. Souza, P. D. Carvalho, R. W. Bender, and A. B. Nascimento. 2012.

Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating

progesterone concentrations in dairy cattle. Reprod. Fertil. Dev. 24:238-243.