



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE

EXPRESSÃO GÊNICA E HEMODINÂMICA DO TRATO
REPRODUTIVO DE VACAS NELORE (*BOS INDICUS*) TRATADAS
COM DIFERENTES INDUTORES DA OVULAÇÃO E eCG EM
PROTOCOLOS DE IATF

ITAMARA GOMES DE FRANÇA

São Luís – MA
2022

ITAMARA GOMES DE FRANÇA

**EXPRESSÃO GÊNICA E HEMODINÂMICA DO TRATO
REPRODUTIVO DE VACAS NELORE (*BOS INDICUS*) TRATADAS
COM DIFERENTES INDUTORES DA OVULAÇÃO E eCG EM
PROTOCOLOS DE IATF**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia– REDE BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Gomes de França, Itamara.

Expressão gênica e hemodinâmica do trato reprodutivo de vacas nelore *Bos indicus* tratadas com diferentes indutores da ovulação e eCG em protocolos de IATF / Itamara Gomes de França. - 2022.

102 p.

Orientador(a): José Ribamar de Souza Torres Júnior.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

1. Éster de estradiol. 2. Genes. 3. Gonadotrofina.
4. Inseminação artificial em tempo fixo. 5. Ultrassom.
I. de Souza Torres Júnior, José Ribamar. II. Título.

ITAMARA GOME DE FRANÇA

**EXPRESSÃO GÊNICA E HEMODINÂMICA DO TRATO
REPRODUTIVO DE VACAS NELORE (*BOS INDICUS*) TRATADAS
COM DIFERENTES INDUTORES DA OVULAÇÃO E eCG EM
PROTOCOLOS DE IATF**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – REDE BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 10/03/2022

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente



JOSE RIBAMAR DE SOUZA TORRES JUNIOR

Data: 14/03/2022 11:44:08-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Documento assinado digitalmente



ALANA LISLEA DE SOUSA

Data: 07/04/2022 19:37:17-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof^a. Dr^a. Alana Lislea de Sousa
Universidade Estadual do Maranhão

Documento assinado digitalmente



NANCYLENI PINTO CHAVES BEZERRA

Data: 06/04/2022 23:15:58-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof^a. Dr^a. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra
Universidade Estadual do Maranhão

Documento assinado digitalmente



JOSE ADALMIR TORRES DE SOUZA

Data: 22/03/2022 10:21:15-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza
Universidade Federal do Piauí

Documento assinado digitalmente



DANILO CUTRIM BEZERRA

Data: 06/04/2022 23:27:30-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Danilo Cutrim Bezerra
Universidade Estadual do Maranhão

À minha irmã “Maninha”

Não poderia dedicar essa tese a outra pessoa além de ti. Foi você que esteve ao meu lado em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins e sempre acreditou na minha capacidade de alcançar meus objetivos. Obrigada por fazer parte desse grande sonho que pude realizar por meio desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, quero agradecer a Deus, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Aos meus pais, Raquel e Edmilson, quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. E graças à união de todos, os obstáculos foram ultrapassados, vitórias foram conquistadas e alegrias divididas. Agradeço pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada. Muitíssimo obrigada!

A minha irmã “Maninha”, pela amizade, carinho e companheirismo de sempre; por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas. Pelo apoio e incentivo incondicional. Muito obrigada!

Ao meu sobrinho Miguel, por ser meu amor, meu porto seguro e a melhor parte de mim. Te amo mil milhões!

Agradeço ao meu orientador, professor Torres Júnior, a oportunidade de tê-lo como orientador de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado. Tenho muito orgulho de citá-lo como um dos responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança, pela amizade, conselhos e por me mostrar como é a vida realmente. O senhor é um exemplo de simplicidade, compreensão e competência. Muito obrigada!

Ao meu cunhado Pedro, pela parceria de sempre e por sempre estar disposto a ajudar a qualquer momento.

Ao meu cachorro Felipe, que sempre que eu estava triste me alegrou (mesmo sem dizer uma palavra) com todo o seu amor.

Aos colegas Diego, Lucas e Gabriela, pela disponibilidade e por toda ajuda na execução do experimento de campo, sem vocês eu não teria conseguido. Muito Obrigada.

Às Professoras Alcina Viera e Larissa Sarmiento e toda equipe do laboratório de Biologia Molecular da UEMA, agradeço a permissão de realização e toda ajuda e orientação para execução de grande parte das análises laboratoriais de todo meu experimento. Muito obrigada!

Aos queridos Professores Nancyleno Pinto e Danilo Bezerra, por toda ajuda e orientação durante as análises de dosagem hormonal, pela sua disponibilidade e importante contribuição de sempre nos trabalhos do nosso grupo de pesquisa. Muito obrigada!

À minha “miguinha” Aline Saldanha, minha irmã, meu exemplo de profissionalismo e humanidade, agradeço por tudo, por me ceder um lar, por me incluir em sua família, que hoje é minha família também, por todo amor, toda parceria nos melhores e piores momentos. Te amo miga!

Às minhas “miguinhas” Grazi e Ysnaia, pela amizade, companheirismo, incentivo e pricipalmente por tornarem toda essa trajetória mais leve e mais feliz, sem vocês tudo seria mais difícil. Amo vocês!

À dona Graça, por todo amor, compreensão e ensinamentos, agradeço pelo lar “meu lar”, pela família “minha família”. Amo a senhora!

À minha amiga Conceição, por toda amizade, ajuda, apoio, preocupação, e por me deixar mexer na sua cozinha ..rsrs.., Muito obrigada amiga!

À minha amiga Mayara, por todo amor, por não soltar a minha mão e por me fazer acreditar que eu conseguiria. Muito obrigada amiga!

À minha amiga Raimunda, minha amiga e colega desde o mestrado, agradeço a amizade, o incentivo e toda ajuda e orientação ao longo desta trajetória. Vencemos Amiga!

Ao meu amigo Jair, pela amizade, companheirismo, apoio e incetivo nesta reta final. Muito obrigada!

Ao Samuel Santos e a Fazenda Gado Manso, pela oputunidade e disponibilização dos animais para a realização deste expeimento e por toda ajuda concedida.

A minha turma de doutorado (turma 2017), obrigada por tudo.

Ao PPG-BIONORTE e a todos os professores pelo conhecimento repassado.

À FAPEMA- Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão pelo apoio finaceiro do expeirimento e pela concessão da bolsa de estudos durante os 4 anos do curso.

Às queridas “vacas”, que são os animais experimentais, aos quais devo todo respeito, admiração, e gartidão por sempre estarem presentes na minha vida tanto acadêmica quanto profissinal. Muito obrigada!

Enfim, quero demonstrar o meu agradecimento, a todos aqueles que, de um modo ou de outro, tornaram possível a realização desta tese.

Muito Obrigada!

*Para todo mal que te fizerem, retribua com o bem.
Não há maldade que se apodere de um coração puro.*

Belchior

RESUMO

FRANÇA, Itamara Gomes de. **Expressão gênica e hemodinâmica do trato reprodutivo de vacas nelore (*Bos indicus*) tratadas com diferentes indutores da ovulação e eCG em protocolos de IATF**. [Reproductive gene expression and hemodynamics of nelore cows (*Bos indicus*) treated with Estradiol plus eCG in TAI protocols]. 2022. 100f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luis, MA, 2022.

Quarenta vacas Nelore foram submetidas ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e distribuídas aleatoriamente em grupos de acordo com o éster de estradiol (E2) (cipionato ou benzoato, ou seja, CE ou BE) e tratamento com gonadotrofina coriônica equina (eCG ou Sem-eCG) em um arranjo fatorial 2x2. Em um dia aleatório do ciclo estral (Dia 0), as vacas receberam um dispositivo intravaginal de P4 junto com a administração de 2 mg de BE. No momento da remoção do dispositivo P4 (Dia 8), as vacas foram tratadas com 0,150 mg de D-cloprostenol (PGF) e divididas aleatoriamente para receber ou não 400 UI de eCG, bem como aleatoriamente designados para receber 1 mg de CE imediatamente (D8), ou 1 mg de BE, 24 h após (D9) conforme estímulos ovulatórios. Portanto, os grupos formados foram CE, CE+eCG, BE e BE+eCG. Foram avaliados os efeitos dos tratamentos sobre o VEGF, Expressão gênica de OXTR e PGR, concentrações de E2/P4 e Dopplerfluxometria do trato reprodutivo. A taxa de ovulação foi maior nos animais submetidos ao tratamento CE + eCG ($p < 0,05$). A vascularização folicular não foi influenciada pelo o indutor de ovulação ($p > 0,05$), embora tenha sido influenciada pelo tratamento com eCG ($p < 0,05$). O BE possibilitou maior taxa de área vascularizada no CL ($P = 0,0192$). Os genes VEGF e PGR foram mais expressos nos animais tratados com BE e eCG. Por outro lado, a expressão do OXTR foi menos evidente em vacas tratadas com eCG. O CE levou a uma razão E2:P4 mais alta no fluido folicular. Este resultado indicou maior atividade estrogênica no D10, o que justificou a maior taxa de ovulação, quando o CE foi associado à eCG ($p < 0,05$). Por fim, os resultados do presente estudo corroboram a hipótese de que os diferentes ésteres de E2 e eCG regulam diferencialmente a vascularização, esteroidogênese, e expressão gênica útero-ovariana em vacas *Bos indicus* submetidas a protocolos de IATF.

Palavras-chave: Inseminação artificial em tempo fixo; Éster de estradiol; Gonadotrofina, Genes; Ultrassom.

ABSTRACT

FRANÇA, Itamara Gomes de. **Reproductive gene expression and hemodynamics of nelore cows (*Bos indicus*) treated with Estradiol plus eCG in TAI protocols.** [Expressão gênica e hemodinâmica do trato reprodutivo de vacas nelore (*Bos indicus*) tratadas com diferentes indutores da ovulação e eCG em protocolos de IATF]. 2022. 100f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luis, MA, 2022.

Forty Nelore cows were submitted to timed artificial insemination (TAI) protocol and randomly assigned to groups according to estradiol (E2) ester (cypionate or benzoate, i.e. EC or EB) and equine chorionic gonadotrophin treatment (eCG or No-eCG) in a factorial 2x2 design. On a random day of the estrous cycle (Day 0), cows received a P4 intravaginal device plus 2 mg im injection of EB. At the time of P4 device removal (Day 8), cows were treated with 0.150 mg im of D-cloprostenol (PGF) and randomly divided to receive or not 400 UI im of eCG, as well as randomly assigned to receive 1 mg of EC immediately (D8), or 1 mg of BE, 24 h after it (D9) as ovulatory stimuli. Therefore, the groups formed were EC, EC+eCG, EB and EB+eCG. Were evaluated the effects of treatments on VEGF, OXTR, and PGR gene expression, E2/P4 concentrations, and Doppler-flowmetry of the reproductive tract. Ovulation rate was higher in animals subjected to the EC + eCG treatment ($p < 0.05$). Follicular vascularization was not influenced by the ovulation inducer ($p > 0.05$), although it was influenced by the eCG treatment ($p < 0.05$). EB enabled higher vascularized area rate in CL ($P = 0.0192$). VEGF and PGR genes were more expressed in animals treated with EB and eCG. On the other hand, OXTR expression was less evident in eCG-treated cows. EC has led to higher E2:P4 ratio in follicular fluid. This outcome indicated higher follicular estrogenic activity at D10, which justified the higher ovulation rate, when EC was associated with eCG ($p < 0.05$). Finally, the results of the present study corroborate the hypothesis that the different E2 esters and eCG differentially regulate vascularization, steroidogenesis, and utero-ovarian gene expression in *Bos indicus* cows submitted to TAI protocols.

Keywords: Timed artificial insemination; Estradiol ester; Gonadotrophin; Genes, Ultrasound.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do protocolo de IATF e procedimentos após a sincronização da ovulação em vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas ao protocolo de indução da ovulação baseado em CE ou BE, em associação ou não, com eCG. US B-mode = exame de ultrassom no modo bidimensional (escala de cinza); DOPPLER = exame de ultrassom no modo Doppler em cores; EC = cipionato de estradiol; EB = benzoato de estradiol; OPU = ovum pickup / aspiração de fluido folicular *in vivo* guiada por ultrassom..... 32
- Figura 2.** Ultrassonografia uterina mostrando fluxo sanguíneo em modo Doppler colorido (A) e a mesma estrutura em modo B (B)..... 33
- Figura 3.** Imagem do CL no modo Color Doppler (A) e a mesma imagem editada pelo Adobe Photoshop CS5 para contagem de pixels coloridos (B)..... 34
- Figura 4.** Efeitos principais da administração de éster de estradiol e eCG nas concentrações de P4 e E2 no soro sanguíneo (D18) e na razão E2: P4 no fluido folicular (D10) de vacas Nelore sincronizadas para IATF. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM. * Diferença significativa entre eCG vs sem eCG ($P < 0,05$). † Diferença significativa entre BE vs CE ($P < 0,05$)..... 41
- Figura 5.** Efeitos dos tratamentos com BE e CE, em associação ou não, com eCG, nas concentrações séricas de P4 e E2 (D18) e na relação E2: P4 no fluido folicular (D10) de vacas Nelore sincronizadas para IATF. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM. ^{abc} Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$)..... 42
- Figura 6.** Efeitos principais da administração de éster de estradiol e eCG na expressão endometrial de VEGF, OXTR e PGR no dia dez (D10) da aplicação do protocolo em vacas Nelore sincronizadas para IATF. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM.* Diferença significativa entre eCG vs sem eCG ($P < 0,05$).† Diferença significativa entre BE vs CE ($P < 0,05$)..... 43
- Figura 7.** Efeitos dos tratamentos com BE, BE + eCG, CE ou CE + eCG na expressão endometrial de VEGF, OXTR e PGR no dia dez (D10) de aplicação do protocolo em vacas Nelore sincronizadas para IATF. Os valores são expressos em média $\pm$ EPM. ^{abc} Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$)..... 44
- Figura 8.** Biplot de Análise de Componentes Principais (PCA) aplicado à relação entre variáveis, obtidas por ultrassonografia modo B e Doppler, concentrações de esteróides sexuais no fluido folicular e expressão gênica uterina em vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas a protocolo de sincronização com diferentes ésteres de estradiol e uso da eCG. OVU = taxa de ovulação; DF = diâmetro do folículo dominante; DFV = vascularização do folículo dominante; UTV = vascularização uterina; E2 = concentrações de estradiol no fluido folicular; P4 = concentração de progesterona no fluido folicular; VEGF = expressão endometrial do gene fator de crescimento endotelial vascular; OXTR = expressão endometrial do gene receptor de oxitocina; PGR = expressão endometrial do gene receptor de progesterona..... 43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Efeitos dos ésteres de estradiol (BE e CE) como indutores de ovulação e sua associação, ou não, com eCG, sobre a resposta folicular ovariana em vacas Nelore (*Bos indicus*) avaliadas por ultrassonografia nos dias 8, 9, 10 e 18 do protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF).[†]..... 38
- Tabela 2.** Efeitos dos ésteres de estradiol (BE e CE) como estimulante ovulatório e sua associação, ou não, com eCG, na vascularização uterina em vacas Nelore (*Bos indicus*) avaliadas por ultrassonografia com Doppler colorido nos dias 8, 9, 10 e 18 do protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF).[†]..... 40

LISTA DE ABREVIATURAS

BE	Benzoato de estradiol
CE	Cipionato de estradiol
cDNA	DNA complementar
CL	Corpo lúteo
E2	Estradiol
ECC	Escore de condição Corporal
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
EM	Estação de monta
ETR	Escore do trato reprodutivo
FD	Folículo dominante
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IP	Índice de pulsatilidade
IR	Índice de resistência
LH	Hormônio luteinizante
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitros
ng	Nanograma
OTR	Receptor de ocitocina
P4	Progesterona
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGF	Prostaglandina
PGF2α	Prostaglandina F2 α
PGR	Receptor de progesterona
mRNA	RNA mensageiro
RT	Real time
TV	Taxa de ovulação
UI	Unidade internacional
US	Ultrassonografia

USD	Ultrassonografia Doppler
VEGF	Fator de crescimento endothelial vascular
VFD	Vascularização do folículo dominante
VUT	Vascularização uterina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos.....	17
1.1.1 Objetivo Geral.....	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Fisiologia reprodutiva da fêmea bovina	19
2.2. Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)	20
2.3. Ésteres de Estradiol na indução da ovulação.....	21
2.4. Gonadotrofina Coriônica equina (eCG)	23
2.5. Ultrassonografia Doppler na avaliação do trato reprodutivo de fêmeas.....	24
2.6. Hemodinâmica do trato reprodutivo	25
2.7. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	27
2.8. Receptor de progesterona no útero (PGR).....	29
2.9. Receptor de ocitocina no endométrio (OTR)	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Local e animais experimentais	30
3.2 Delineamento experimental	31
3.3 Protocolo hormonal	31
3.4 Avaliações ultrassonográficas.....	33
3.5 Recuperação <i>in vivo</i> do Fluido Folicular	34
3.6 Biopsia uterina	34
3.7 Extração de RNAm Transcrição Reversa	35
3.8 PCR em Tempo Real (RT-PCR)	35
3.9. Concentrações de estradiol (E2) e progesterona (P4) no líquido folicular e no plasma sanguíneo	36
3.10. Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS.....	37
5. DISCUSSÃO.....	47
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS.....	68

1. INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva é o fator que mais influencia a produtividade e a lucratividade de rebanhos bovinos comerciais. Dentre as estratégias utilizadas mundialmente para que se aumente a taxa de serviço das fêmeas em reprodução, está o uso programado de análogos dos hormônios reprodutivos para prática de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). O uso programado de hormônios reprodutivos, e de seus análogos em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é a principal estratégia adotada para aumentar a taxa de serviço de vacas em reprodução. Este procedimento permite sincronizar tanto a ovulação quanto a inseminação de todas as fêmeas disponíveis para reprodução. No entanto, as taxas de fertilização na primeira inseminação artificial têm historicamente atingido 50% (BARUSELLI *et al.*, 2012; WILTBANK e PURSLEY, 2014), indicando que um número significativo de fêmeas inseminadas não emprenhou.

Diferentes estratégias têm sido propostas com o objetivo de melhorar a eficiência das técnicas de sincronização para IATF. Entre elas, encontra-se o uso da gonadotrofina coriônica equina (eCG) para estimular o crescimento do folículo pré-ovulatório, aumentar a produção de progesterona (P4) pelo corpo lúteo (CL) e melhorar as taxas de concepção (BÓ *et al.*, 2002; SÁ FILHO *et al.*, 2009; SALES *et al.*, 2011). Além disso, o benzoato de estradiol (BE) é administrado no início do protocolo para induzir atresia nos folículos em desenvolvimento, resultando na emergência de uma nova onda folicular (DRIANCOURT, 2001). Mais recente, o cipionato de estradiol (CE) tem sido amplamente utilizado no momento da remoção do dispositivo intravaginal para induzir o pico de LH entre 45 e 49 horas, bem como a ovulação entre 67 e 70 h após o tratamento (SALES *et al.*, 2012).

A utilização destes hormônios exógenos nos protocolos de IATF resulta em expressão gênica diferencial no endométrio bovino (SHIMIZU *et al.*, 2010). Os efeitos genômicos dos hormônios esteroides, estradiol (E2) e P4, no endométrio são mediados principalmente por meio da ligação com seus receptores (ROBINSON *et al.*, 2001; OKUMU *et al.*, 2010). Entre os genes de importância neste contexto, encontram-se VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), OXTR (receptor de oxitocina) e PGR (receptor de progesterona), que estão associados à angiogênese, desenvolvimento folicular e uterino (SMITH, 2001; ARTAC *et al.*, 2009), bem como com a receptividade uterina para implantação embrionária (BRATTA *et al.*, 1996; BRIDGES *et al.*, 2005; HAOUZI *et al.*, 2009).

As alterações nas concentrações séricas de P4 no início da fase luteínica são capazes de provocar variações temporais na composição e quantidade de transcritos no endométrio bovino (FORDE *et al.*, 2011; MESQUITA *et al.*, 2014). O E2 aumenta a expressão dos seus receptores, bem como de PGR e OXTR no endométrio (LAMMING e MANN, 1995; BOOS *et al.*, 1996; ROBINSON *et al.*, 2001).

Além disso, os hormônios exógenos modulam o padrão vascular do trato reprodutivo (FORD e CHENAULT, 1981; BOLLWEIN *et al.*, 2000;). Em fêmeas bovinas, assim como em outras espécies, o útero sofre alterações fisiológicas ao longo do ciclo estral, sendo o estágio deste diretamente relacionado à perfusão vascular uterina (BOLLWEIN *et al.*, 1998; 2002). Estas alterações são reguladas pelos hormônios esteroidais e por uma rede de complexas interações entre fatores de crescimento locais, secretados pelo epitélio e estroma uterinos (ROMAN-PONCE *et al.*, 1983; BOLLWEIN *et al.*, 2002; SAGSOZ e SARUHAN, 2011).

O E2 é um hormônio esteroidal conhecido por seu efeito vasodilatador (FORD, 1982; GINTHER, 1992), enquanto a P4 aumenta a receptividade do útero para o embrião através da indução da angiogênese endometrial (WEN *et al.*, 2009). Alguns estudos demonstram a influência da administração da eCG na formação e vascularização do CL, produção de P4 e aumento do fluxo sanguíneo uterino, tanto em vacas receptoras como também em doadoras de embriões (FUCK *et al.*, 2002; BARUSELLI *et al.*, 2004; HONNENS *et al.*, 2008).

Assim, a expressão gênica e o padrão vascular sanguíneo no trato reprodutivo podem ser regulados por hormônios exógenos utilizados nos protocolos de IATF. Diante disso, acredita-se que o uso dos indutores de ovulação benzoato de estradiol (BE) e cipionato de estradiol (CE) associados ou não à gonadotrofina coriônica equina (eCG) modulam a expressão endometrial dos genes associados à reprodução e alteram a vascularização utero-ovariana.

1.1 Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Analisar a influência dos protocolos hormonais na hemodinâmica e expressão gênica, que estão diretamente ligados à capacidade ovulatória dos folículos, desenvolvimento do CL, esteroidogênese gonadal e respostas endometriais associadas.

1.1.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito dos indutores da ovulação benzoato de estradiol (BE) e cipionato de estradiol (CE) e da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em vacas Nelore (*Bos indicus*) sobre:

- A quantificação da expressão dos genes PGR, VEGF e OXTR no endométrio no dia da IATF;
- A vascularização do útero-ovariana;
- As concentrações de progesterona e estradiol no líquido folicular no dia da IATF;
- As concentrações séricas de progesterona e estradiol no diestro subsequente à IATF;
- Relacionar os dados da expressão gênica com a resposta dopplerfluxométrica uterina, concentrações de progesterona e estradiol no líquido folicular e no plasma sanguíneo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fisiologia reprodutiva da fêmea bovina

Compreender os fenômenos fisiológicos reprodutivos da fêmea bovina, associados aos mecanismos que ocorrem no trato reprodutivo, é de fundamental importância para otimizar a utilização das biotécnicas reprodutivas e a eficiência reprodutiva dos rebanhos (BARUSELLI *et al.*, 2007).

O ciclo estral em bovinos tem uma duração média de 21 dias, e é caracterizado por uma série de alterações hormonais, morfológicas e comportamentais (MOREIRA *et al.*, 2002; ALBUQUERQUE *et al.*, 2004; JAINUDEEN e HAFEZ, 2004). As características do ciclo estral são influenciadas por vários fatores, entre eles a idade (DE SILVA *et al.*, 1981), produção de leite (VAN VLIET e VAN EERDENBURG, 1996), condições ambientais (WHITE *et al.*, 2002) e fatores sociais (hierarquia) (LANDAETA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2004).

Em cada fase do ciclo estral ocorrem mecanismos físicos e químicos que são basicamente regulados por hormônios através de um mecanismo de feedback. Vários hormônios participam direta ou indiretamente de eventos reprodutivos em fêmeas bovinas. O FSH (Hormônio Folículo Estimulante) estimula o crescimento folicular e contribui para a formação de receptores de LH (Hormônio Luteinizante) e FSH no folículo, estando diretamente envolvido na fase de recrutamento de uma onda de crescimento folicular. Já o aumento da frequência e amplitude dos pulsos de LH, induz o crescimento do folículo dominante na fase pós-divergência, além da ovulação, que é desencadeada a partir da liberação de um pico consistente deste mesmo hormônio (DRIANCOURT, 2001; FORTUNE *et al.*, 2001).

O estrógeno atua na receptividade sexual (aceitação de monta) durante o estro, promove o relaxamento da cérvix e tem efeito feedback (+) para estimular o pico de LH (SILVA *et al.*, 2011).

A progesterona e os progestágenos atuam inibindo a motilidade uterina espontânea e são essenciais para a manutenção de gestações (HADLEY, 1996). As prostaglandinas executam funções em muitas células e tecidos corporais, sendo que em relação aos eventos reprodutivos da fêmea bovina, a F2 α tem a função de realizar a luteólise (WAITE *et al.*, 2005; TANIKAWA *et al.*, 2005; WEEMS *et al.*, 2010).

A população de folículos ovarianos apresenta uma grande variação em número, tamanho e taxas de crescimento, em uma dinâmica contínua das fases de recrutamento, seleção e dominância. Em bovinos, o desenvolvimento folicular acontece em um padrão de ondas, no qual cada onda de crescimento é caracterizada por um grupo de pequenos folículos que são recrutados (emergência

folicular) e iniciam uma fase de crescimento comum por cerca de três dias (GINTHER *et al.*, 2003). Destes, apenas um continua seu desenvolvimento (folículo dominante), enquanto os outros sofrem decréscimo de tamanho (folículos subordinados) (LUCY *et al.*, 1992). O folículo dominante de cada onda é capaz de inibir o crescimento e induzir a atresia dos demais folículos em desenvolvimento, além de bloquear o surgimento de uma nova onda folicular (PIERSON e GINTHER, 1988; SÁVIO *et al.*, 1988; ASSEY *et al.*, 1993). O folículo na fase de dominância só chegará à ovulação na segunda ou terceira onda de crescimento, em função da regressão das concentrações plasmáticas de progesterona e produção contínua de 17β -estradiol e inibina, ovulando logo após o pico de secreção de LH (GINTHER, 1988; GINTHER *et al.*, 1989; FORTUNE *et al.*, 2004).

Em bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), o desvio folicular tem início por volta do dia 2,5 a 2,7 após a emergência da onda (GIMENES *et al.*, 2005; SARTORELLI *et al.*, 2005; CASTILHO *et al.*, 2006), e de acordo com Martinez *et al.* (2004) a seleção do folículo dominante fica evidente três dias após a emergência da onda. Contudo, apesar de relatos sobre a aquisição de receptores de LH pelo folículo dominante no momento da divergência, existem estudos demonstrando que este folículo ainda não é responsivo a um indutor da ovulação (BARUSELLI *et al.*, 2007). Sartori *et al.* (2001), verificaram em vacas Holandesas que os folículos alcançam a capacidade ovulatória somente após atingirem 10 mm de diâmetro. Novilhas *Bos taurus indicus* (Nelore e Gir) que foram tratadas com 25 mg de LH quando o folículo dominante atingiu um diâmetro médio de 7,7 mm tiveram uma taxa de ovulação de apenas 33%, enquanto que novilhas da mesma raça com diâmetro médio de 10 mm tiveram uma taxa de ovulação superior a 90% (GIMENES *et al.*, 2005).

Em zebuínos (*Bos indicus*), o diâmetro médio de folículos pré-ovulatórios está entre de 11,3 e 12,1 mm (FIGUEIREDO *et al.*, 1997) e, o corpo lúteo varia de 17 a 21 mm em seu diâmetro máximo (RHODES *et al.*, 1995; FIGUEIREDO *et al.*, 1997). De acordo com Gimenes *et al.* (2008), a capacidade ovulatória de um folículo em protocolos hormonais de IATF é dependente do tamanho que o folículo se encontra no momento da aplicação do indutor da ovulação, sendo essa uma das grandes causas de variações em protocolos hormonais. Além disso, Sá Filho *et al.* (2011) descreveram que a mensuração do folículo dominante no momento da IA é uma importante estratégia para prever uma alta chance de gestação em fêmeas zebuínas.

2.2. Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)

A Inseminação Artificial (IA) mostrou ser uma técnica viável e economicamente eficaz para um melhor retorno econômico e aceleração no ganho genético. Dentre suas vantagens, destacam-se a padronização do rebanho, controle de doenças sexualmente transmissíveis, melhor organização da

fazenda, diminuição no custo de reposição de touros, maior conhecimento técnico dos funcionários, uso de sêmen de reprodutores que já vieram a óbito, etc. Contudo, o principal benefício dessa técnica é o melhoramento genético, utilizando sêmen de touros avaliados, para obtenção de crias com alto potencial produtivo (ASBIA, 2007).

Porém, com a evolução e o emprego da técnica em grande escala, os problemas como detecção de estro e principalmente a necessidade de mão de obra em tempo integral, levaram pesquisadores a buscarem técnicas alternativas sem comprometer os índices de reprodução (BARUSELLI *et al.*, 2004). Então, surgiram as técnicas de inseminação sem a necessidade de detecção de estro, ou seja, a inseminação artificial em tempo fixo, que por meio da utilização de hormônios, induz a sincronização do estro e da ovulação (WILTBANK *et al.*, 1971; MARTINEZ *et al.*, 1998), levando a um aumento na eficiência reprodutiva, redução do intervalo entre partos e concentração de nascimento de bezerros em épocas do ano estratégicas (MALUF, 2002).

A IATF necessita de investimento inicial, e seus resultados nem sempre são demonstrados no primeiro momento de sua implantação, surgindo, além das vantagens, gastos diretos e indiretos como: adoção de instrumentos de controle e de manejo, aquisição de hormônios, serviços veterinários, sendo estes muitas vezes uma dificuldade por parte do produtor para iniciar sua implantação (FERRAZ, 1996; PEREIRA, 1999, ASBIA, 2003). Relação custo/benefício merece total atenção para empregar biotécnicas, tendo que ser levado em conta todos os custos e benefícios, que nem sempre são fáceis de detalhar e quantificar (MARION, 2001).

2.3. Ésteres de Estradiol na indução da ovulação

Para viabilizar a IATF, diversos protocolos hormonais têm sido elaborados na tentativa de controlar as funções ovarianas foliculares e luteais. Para este fim, muitos são os hormônios, destacando a P4 e BE, na finalidade de induzir atresia de folículos presentes e sincronizar a emergência de nova onda folicular no início do protocolo, e após remoção do dispositivo impregnado de P4 a administração concomitante de prostaglandina para assegurar a luteólise e, por fim, aplicação de um éster de estradiol, GnRH ou LH para induzir a ovulação sincronizada (BÓ *et al.*, 2003).

O controle preciso do momento da ovulação é de fundamental importância para a IATF, visto que inseminações próximas ao momento da ovulação levam a índices maiores de prenhez. Em bovinos, os indutores da ovulação mais utilizados são o BE e o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), porém, no Brasil, os ésteres de estradiol são os mais utilizados devido a sua eficiência (MENEGETTI *et al.*, 2009) e seu menor custo, quando comparado ao de outros acima citados (CARVALHO *et al.*, 2017). Mais recentemente, a prostaglandina também tem sido estudada como

agente indutor da ovulação (PFEIFER *et al.*, 2014; 2016; CARVALHO *et al.*, 2017; GOBIKRUSHANTH *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Os ésteres de estradiol são comumente empregados em protocolos de IATF a fim de promover o controle farmacológico do ciclo estral, uma vez que na ausência de progesterona sua administração pode estimular a liberação endógena de GnRH e LH e causar a ovulação do FD (MOENTER *et al.*, 1990). O E2 também tem funções na fisiologia reprodutiva como expressão de estro, por exemplo (ALLRICH, 1994).

Dentre os principais ésteres de estradiol utilizados em programas reprodutivos de fêmeas bovinas temos o benzoato de estradiol (BE) e o cipionato de estradiol (CE). Porém, ambos são diferentes quanto a sua utilização, pois possuem meias-vidas distintas, devido a peculiaridades na esterificação da molécula, conduzindo assim a alterações na absorção e, conseqüentemente, no metabolismo (SOUZA *et al.*, 2005; MENEGHETTI *et al.*, 2009).

A administração do BE gera uma ação mais rápida, por ser exatamente a molécula bioativa e não necessitar ser transformado no organismo, conforme Larson e Ball (1992) observaram em seus estudos, constatando aumento das concentrações de estradiol na circulação em duas horas pós-administração e retornando a níveis basais em seis horas.

O CE, por ser formado pela esterificação do ácido propiônico ciclo pentano, resulta em baixa solubilidade em água e, sendo assim, liberação mais lenta no local de administração, prolongando a atividade biológica quando comparado ao BE (VYNCKIER *et al.*, 1990).

O conhecimento dessas características distintas é fundamental para determinar o momento mais adequado para administração desses indutores da ovulação em protocolos de IATF a fim de garantir resultados satisfatórios.

Neste sentido, diversos estudos foram conduzidos para avaliar o tempo de ação e eficiência dos diferentes indutores em vacas de corte, sendo que a utilização do BE 24h após a remoção do dispositivo de P4 intravaginal (BARUSELLI *et al.*, 2006), induziu o pico de LH em 16h, e as ovulações em 40h após a sua administração (HANLON *et al.*, 1997). Já, o uso do CE no momento da retirada do dispositivo de P4 resultou em um pico de LH e ovulação 38 e 66h após, respectivamente (AMBROSE *et al.*, 2001). Além disso, estudos conduzidos por Crepaldi *et al.* (2008) revelaram que a administração do CE simultânea a retirada do dispositivo de P4 promoveu a ovulação de forma sincronizada, em cerca de 72h após seu uso, resultando em um momento semelhante ao protocolo em que se empregou o BE 24h após a remoção da progesterona. Outros experimentos demonstraram que a substituição do BE, pelo CE aplicado no momento de retirada da progesterona (AYRES *et al.*, 2006), eliminaria o manejo adicional, tornando a execução dos protocolos mais simples (CREPALDI, 2009).

Segundo Pancarci et al. (2002), a administração de 2mg de CE (intramuscular) promove aumento nas concentrações plasmáticas de E2 12 horas após a administração, pico em 36 e permanência sanguínea de mais de 96 horas. A utilização de 1 mg de BE intramuscular induz a um rápido aumento nas concentrações de estradiol no plasma após quatro horas, mantendo-se elevada por 24 horas (BURKE *et al.*, 2000).

Estudos realizados por Uslenghi et al. (2016) e Sales *et al.* (2012) mostraram o perfil plasmático do 17 β estradiol após a utilização de diferentes indutores da ovulação (BE e CE), concluindo que, considerando as características peculiares a cada fármaco, podemos utilizar qualquer um dos ésteres de estradiol obtendo eficácia comprovada.

2.4. Gonadotrofina Coriônica equina (eCG)

A eCG é um fármaco de meia vida longa (até 3 dias), produzido nos cálices endometriais da égua prenhe (40 a 130 dias; MURPHY e MARTINUK, 1991) que se liga aos receptores de FSH e LH dos folículos e aos receptores de LH do corpo lúteo (STEWART e ALLEN, 1981; CAVALIERI *et al.*, 1997; PEGORER *et al.*, 2011).

A eCG é formado por duas subunidades (α - composta por 96 aminoácidos; e β - composta por 149 aminoácidos). Uma característica importante da molécula de eCG é a existência da grande quantidade de carboidratos (aproximadamente 45% de sua massa), principalmente a N-acetil neuramina, ou ácido siálico, primordialmente presente na subunidade β da molécula de eCG, o que proporciona uma grande meia vida a este composto químico (MURPHY e MARTINUK, 1991). Ainda, devido ao alto peso molecular e à presença de ácido siálico, a molécula de eCG é carregada negativamente, o que dificulta a sua filtração glomerular e aumenta ainda mais sua meia-vida. Devido a todos estes fatores, a meia-vida da eCG quando aplicado em bovinos é considerada longa (SOUZA *et al.*, 2009).

De acordo com Baruselli et al. (2004a), a eCG, quando administrado nas vacas em anestro, cria condições para estimular o crescimento folicular e a ovulação, mesmo em vacas que tenham comprometimento na liberação de gonadotrofinas. Seu uso tem apresentado efeito positivo em rebanhos com baixa taxa de ciclicidade (anestro), em animais recém-paridos (período pós-parto inferior a 2 meses) (BARUSELLI *et al.*, 2004) e aumenta a taxa de prenhez (MARQUES *et al.*, 2005). Ainda, devido a sua ação mimetizar as ações de LH e FSH e sua meia vida ser longa (três dias), a eCG pode ser utilizado em dose única nos protocolos para superovulação em bovinos (BARUSELLI *et al.*, 2008).

O emprego da eCG também tem sido relatado em receptoras de embrião, que recebem eCG

durante o tratamento de sincronização apresentando um aumento na taxa de ovulação e de aproveitamento, além de possuírem maiores níveis de progesterona circulante no diestro (BARUSELLI *et al.*, 2000), minimizando falhas no reconhecimento da gestação e aumentando a eficiência da transferência de embriões (BINELLI, 2001).

Diversos autores consideram o uso da eCG como uma ferramenta para melhorar as concentrações plasmáticas de P4 durante o ciclo estral (FUENTES e DE LA FUENTES, 1997; BARUSELLI *et al.*, 2000) podendo atuar de forma diferente dependendo do período estral que se inicia o tratamento (SÁ FILHO *et al.*, 2010).

Assim, a estimulação com a utilização da eCG causa um aumento folicular associado a um acúmulo de expressão do mRNA de proteínas que são importantes para a produção de pregnenolona, proporcionando maior quantidade dos precursores de progesterona. Há abundância de mRNA de StAR em folículos médios e grandes que receberam estimulação com eCG (SOUMANO e PRICE, 1997). Além disso, foi observado aumento da expressão gênica e protéica da proteína StAR no corpo lúteo dos animais estimulados e superovulados seguido pelo aumento na produção de progesterona por corpo lúteo dos animais estimulados (FÁTIMA, 2008).

Os resultados da estimulação com eCG, quando comparados com os de FSH, são duas vezes maiores em relação ao crescimento folicular, ovulação e concepção dos animais, devido ao seu tempo de atuação no organismo que é de 3 dias, enquanto que com o FSH é de apenas alguns minutos (SALES *et al.*, 2011).

Alguns trabalhos demonstram a influência da administração da eCG na formação e vascularização do CL, produção de P4 e fluxo sanguíneo uterino, tanto em vacas receptoras (estimulação do folículo dominante) como também em doadoras (superovulação) (FUCK *et al.*, 2002; BARUSELLI *et al.*, 2004b; HONNENS *et al.*, 2008). Nas técnicas de IATF (tratamento estimulatório), por exemplo, nas quais a eCG é amplamente empregada, foram observados aumento tanto no volume do CL quanto na produção de P4 (SÁ FILHO *et al.*, 2010; SALES *et al.*, 2011;). Outro tratamento no qual a eCG também pode ser utilizada é o de superovulação; no entanto, o FSH tem sido o mais utilizado, o qual causa importantes alterações nos CL formados, tais como o aumento da expressão de fatores angiogênicos e da vascularização, bem como o aumento da produção de P4 (PAPA *et al.*, 2007; FÁTIMA, 2008).

2.5. Ultrassonografia Doppler na avaliação do trato reprodutivo de fêmeas

A US Doppler tem sido aplicada para avaliação do trato reprodutivo de grandes animais, pois permite a realização de um exame em tempo real e de maneira não invasiva da perfusão sanguínea

uterina e ovariana (BOLWEIN *et al.*, 2003; GINTHER *et al.*, 2007).

É de grande importância o estudo da hemodinâmica do trato reprodutivo de fêmeas, sendo o sistema vascular responsável pelas trocas de nutrientes, gases, hormônios, fatores de crescimento e excreções entre tecidos e órgãos (FABER e THORNBURG, 1983). Herzog e Bollwein (2007) relataram o uso da US Doppler colorido como ferramenta para investigação do fluxo sanguíneo genital. Por meio dessa técnica, a perfusão sanguínea dos ovários e do útero pode ser acessada, sendo as imagens avaliadas subjetivamente ou objetivamente (GINTHER, 2007).

Pareja *et al.* (2010) relataram a possibilidade do mapeamento com Doppler colorido do sítio ovariano podendo observar e estimar quantitativamente as mudanças da vascularização intraovariana. Miyamoto *et al.* (2006) descreveram a importância da utilização da US Doppler para identificar o fluxo sanguíneo local, proporcionando uma estimativa facilmente obtida do *status* folicular, do CL e do conceito.

A dinâmica folicular, ovulação, formação do CL, bem como a preparação do endométrio para a gestação são dependentes do estabelecimento de vascularização adequada para uma melhor produção hormonal durante as diferentes fases do ciclo estral (PINTO, 2009).

Neste contexto, a US Doppler tem se mostrado como um método inovador, ainda pouco usado e mais sensível na avaliação da vascularização do trato reprodutivo de fêmeas bovinas.

2.6. Hemodinâmica do trato reprodutivo

É sabido que uma pobre perfusão uterina pode ser a causa de infertilidade em fêmeas, estudos realizados em mulheres demonstraram que uma baixa perfusão uterina durante a fase luteínica está associada com uma baixa taxa de concepção (BOLLWEIN *et al.*, 1997).

Bollwein *et al.* (1997) afim de demonstrar a diferença na perfusão uterina durante o ciclo estral em éguas observaram que o fluxo sanguíneo na artéria uterina direita ou esquerda não diferiram durante a ovulação, sendo o fluxo arterial uterino independente do ovário que ocorre a ovulação. Verificaram também, que a perfusão vascular na artéria uterina se mantém constante durante o ciclo estral, assim como em outras espécies domésticas (FORD *et al.*, 1979).

As mudanças na hemodinâmica ovariana estão diretamente ligadas aos processos de transformação folicular durante os diferentes momentos do ciclo estral, incluindo crescimento folicular, ovulação, luteogênese e luteólise (COLLINS *et al.*, 1991; BRANNSTROM *et al.*, 1998; ACOSTA *et al.*, 2002).

O desenvolvimento do folículo ovariano está intimamente relacionado com o desenvolvimento de uma rede vascular na camada da teca, que fornece nutrientes, hormônios e

oxigênio para suportar o crescimento folicular e a esteroidogênese. Já na camada granulosa, não há vasos sanguíneos, os metabolitos alcançam o ambiente intra folicular por difusão (VIANA *et al.*, 2013).

Em cadelas, foi observada uma mudança no padrão vascular ovariano durante as fases do ciclo estral, com um aumento gradual da perfusão ovariana durante o proestro (KÖSTER *et al.*, 2001). Estes mesmo autores observaram que no período pré-ovulatório, houve um aumento marcante da intensidade da cor e da velocidade de fluxo sanguíneo intraovariano, com um declínio nos índices de resistência (IR) e pulsatilidade (IP). Durante a ovulação e no início da fase luteal, a perfusão observada foi máxima.

Mudanças no fluxo sanguíneo e na sua intensidade promovem alterações diretas na biossíntese de E2 e P4 (MURDOCH *et al.*, 1986; ACOSTA *et al.*, 2002). No CL, também é essencial uma boa vascularização, pois esta fornece substrato para a biossíntese de P4 e hormônios esteróides pelas células luteínicas. Dessa forma, a circulação sanguínea é vital para que o CL mantenha suas propriedades funcionais (BOLLWEIN *et al.*, 2002).

Segundo Wiltbank (1994) o fluxo sanguíneo para o CL é maior do que para qualquer outro tecido no corpo. No diestro, de 65 a 95% do fluxo sanguíneo do ovário é destinado ao CL. Um estudo com éguas caracterizou a relação entre a perfusão sanguínea com o desenvolvimento (estrutural e funcional) do CL (GINTHER *et al.*, 2007).

Não existe uma relação entre o diâmetro luteínico e as mudanças do fluxo sanguíneo da artéria ovariana ipsilateral ao CL, sugerindo que o processo de neovascularização não está associado às dimensões do CL (BOLLWEIN *et al.*, 2002). Durante o desenvolvimento inicial do CL, o fluxo sanguíneo aumenta paralelamente ao aumento da concentração circulante de P4, sendo então a vascularização associada ao potencial em produzir P4 (ACOSTA *et al.*, 2003).

Considerando a íntima relação entre a perfusão vascular do CL e as concentrações séricas de P4, a US Doppler pode ser utilizada no momento da seleção da receptora para a avaliação da funcionalidade do CL. Mattioli *et al.* (2001) conseguiram, em seus estudos, relacionar o diâmetro do folículo ovariano, concentrações de estrógeno intra foliculares e a área de fluxo sanguíneo, indicando a possibilidade de associação entre a US modo B, modo Doppler colorido e as concentrações hormonais.

Alterações estruturais e funcionais que ocorrem no folículo podem estar associadas com um aumento local de fluxo sanguíneo no folículo pré-ovulatório que levaria à maior suprimento de gonadotrofinas e outros fatores hormonais necessários para a maturação folicular (ACOSTA *et al.*, 2003; ACOSTA e MIYAMOTO, 2004). Miyamoto *et al.* (2006) confirmaram que as mudanças estruturais e funcionais causadas pelo LH em folículos maduros estão associadas ao aumento do fluxo

sanguíneo na parede dos folículos.

Ginther (1992) e Christensen (2011) relataram um aumento do E2 no início do diestro em éguas, que pode coincidir com a elevação da irrigação uterina neste mesmo momento. Diferentemente do observado em éguas, em vacas houve uma correlação positiva do E2 com o fluxo sanguíneo da artéria uterina ao longo do ciclo estral (BOLLWEIN *et al.*, 2000), enquanto em ovelhas não foi encontrada correlação deste hormônio com a perfusão vascular do útero (ROMAN-PONCE *et al.*, 1983; SPRAGUE *et al.*, 2009).

O útero sofre alterações fisiológicas ao longo do ciclo estral, sendo o estágio deste diretamente relacionado à perfusão vascular uterina (BOLLWEIN *et al.*, 1998; 2002). Estas alterações são reguladas pelos hormônios esteroidais (E2 e P4) e por uma rede de complexas interações entre fatores de crescimento locais, secretados pelo epitélio e estroma uterinos (ROMAN-PONCE *et al.*; 1983; BOLLWEIN *et al.*; 2002; SAGSOZ e SARUHAN, 2011). O E2 é um hormônio esteroide que, conhecidamente, apresenta efeito vasodilatador (FORD, 1982; GINTHER, 1992).

Quando estudadas as concentrações plasmáticas da P4, estas não se correlacionaram à perfusão vascular uterina ao longo do ciclo estral tanto em éguas quanto em vacas (BOLLWEIN *et al.*, 2000; 2002). Já na mulher existe uma alta correlação positiva da P4 com a irrigação uterina, apenas durante o diestro (RAINE- FENNING *et al.*, 2004). Ao analisar a relação existente entre os hormônios esteroidais, em ovelhas, vacas e porcas houve uma alta correlação do fluxo sanguíneo uterino com a relação E2/P4 (FORD, 1982; ROMAN-PONCE *et al.*, 1983; SPRAGUE *et al.*, 2009).

Em um estudo realizado por Bollwein *et al.* (2002), não foi verificada relação entre as concentrações plasmáticas de estrógeno e a variação no IR vascular no útero durante todo o ciclo estral. Dessa forma, não somente o estrógeno mas outros fatores estão relacionados com a regulação do fluxo vascular uterino.

2.7. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é uma proteína que tem uma função dinâmica de regulação do crescimento vascular endotelial, angiogênese e permeabilidade vascular (FERRARA *et al.*, 1998; HAOUZI *et al.*, 2009). Por estar associado com a angiogênese e vascularização dos tecidos, é considerado um dos marcadores da receptividade do útero para implantação (HAOUZI *et al.*, 2009).

A produção e a expressão do VEGF no útero são essenciais para um bom desenvolvimento reprodutivo (GEVA e JAFFE, 2000). Sua atuação em associação com hormônios esteróides tem efeitos locais na angiogênese para um bom desenvolvimento do endométrio uterino (HYDER *et al.*,

1996; FERRARA *et al.*, 2003).

Entre os fatores que aumentam a sua expressão, podemos citar os hormônios esteróides ovarianos (HYDER, 2002), as prostaglandinas (GATELY, 2000), o FSH (PAPA *et al.*, 2007), o hCG (FILICORI *et al.*, 2005) e a própria eCG (SHIMIZU *et al.*, 2002). O VEGF é expresso no endométrio (SMITH, 2001), sendo um fator importante na regulação dos eventos de implantação e início do estabelecimento da placenta (MATSUMOTO *et al.*, 2002), proliferação das células endoteliais dos vasos sanguíneos, formação e função vascular (SMITH, 1998; SMITH, 2001). Alterações na expressão do sistema VEGF estão associadas a disfunções ovarianas e uterinas (FERRARA *et al.*, 2003).

O VEGF é um importante regulador do desenvolvimento tanto da angiogênese como da vasculogênese embrionária de camundongos. Ele também está envolvido no crescimento do esqueleto, na formação óssea endocondral e na angiogênese das glândulas endócrinas (FERRARA, *et al.*, 2003; FERRARA, 2004).

Em fêmeas, o VEGF desempenha um papel importante no crescimento dos folículos ovarianos e no desenvolvimento e manutenção do CL pela mediação de angiogênese no ovário. Defeitos na angiogênese podem causar alguns transtornos, como involução ovariana, perda da gestação, síndrome de hiperestimulação ovariana e neoplasias de ovário (GEVA e JAFFE, 2000). Artac *et al.* (2009) demonstraram que o VEGF está envolvido na ativação, maturação e sobrevivência de folículos primordiais. Hervé *et al.* (2006) relataram em seu trabalho que a variabilidade na expressão do sistema VEGF está associada a alterações funcionais no útero e nos ovários.

O crescimento cíclico do endométrio depende da proliferação capilar e do aumento no fluxo sanguíneo causado por vasodilatação e alterações na permeabilidade vascular (GIUDICE, 1996). Essas mudanças são reguladas por E2 e P4 através da ativação de seus receptores (PERROT-APPLANAT *et al.*, 1994, LECCE *et al.*, 2001), essenciais para o desenvolvimento da vascularização uterina durante a angiogênese (HERYANTO *et al.*, 2003).

Sabe-se que o 17 β -estradiol é necessário para o desenvolvimento do CL e a manutenção de suas funções durante a prenhez aumentando a expressão do VEGF em células granulosas luteinizadas (GARRIDO *et al.*, 1993). Por um lado, a inibição do VEGF *in vivo* durante a fase luteínica média em primatas não humanos impede a angiogênese luteínica e suprime a secreção de P4 (WULFF *et al.*, 2000). Por outro lado, a PGF2 α influencia negativamente a expressão do sistema VEGF (VONNAHME *et al.*, 2005).

2.8. Receptor de progesterona no útero (PGR)

A P4 regula a função reprodutiva através de receptores intracelulares que pertencem a uma superfamília de receptores nucleares, na qual estão inclusos não só receptores esteróides, mas também os de Vitamina D, hormônio da tireóide e receptores órfãos (CARSON-JURICA *et al.*, 1990; TSAI e O'MALLEY, 1994; KUMAR *et al.*, 2003).

Existem duas formas de receptores de P4 que diferem em suas atividades funcionais. Eles são divididos em receptor de P4 A (PR-A) e B (PR-B). Ambas as isoformas são co-expressas na maioria dos tecidos alvo e a razão de existirem duas formas de receptores de P4 é a função exercida de acordo com o tipo celular onde atuam (LI e O'MALLEY, 2003). E são codificadas pelo mesmo gene, mas são reguladas por promotores diferentes (MOTE *et al.*, 2006). A isoforma A atua principalmente mediando a ação da P4 no útero e ovários, enquanto a isoforma B é mais importante no desenvolvimento da glândula mamária (MULAC-JERICEVIC *et al.*, 2000, 2003).

Os receptores P4 são ativados a partir da dissociação e dimerização de moléculas da proteína chaperone, seguido de uma ligação do complexo esteróide-receptor geralmente localizado na região promotora do gene (TSAI e O'MALLEY, 1994; KUMAR *et al.*, 2003).

A P4 no útero de animais adultos tem efeito no aumento das taxas de concepção e desenvolvimento uterino (BARTOL *et al.*, 1988; 1999).

No endométrio, a P4 induz diferenciação das células do estroma, estimula a secreção glandular, promove acúmulo de vacúolos basais no epitélio glandular (MASLAR., 1986), altera o padrão de secreção das proteínas das células endometriais e induz ao relaxamento do miométrio (BRATTA *et al.*, 1996). A P4 ainda promove uma diminuição na regulação da expressão dos genes que regulam os canais dependentes de cálcio, dificultando a entrada de cálcio na célula (TEZUCA *et al.*, 1995).

Desta maneira, as ações da P4 promovem condições essenciais no desenvolvimento uterino para uma futura prenhez.

2.9. Receptor de ocitocina no endométrio (OTR)

Os receptores de ocitocina (OTR) também estão presentes no corpo lúteo, endométrio e miométrio (FENGL *et al.*, 2000).

A expressão do OTR desempenha um papel importante no início da luteólise em ruminantes (MCCRACKEN *et al.*, 1999) e é regulada principalmente pela ação dos estrógenos E2 e P4 (SILVIA *et al.*, 1991; ROBINSON *et al.*, 2001). Ambos desempenham papel crucial na regulação do ambiente

uterino para o estabelecimento da gestação (ROBINSON *et al.*, 2001).

Um estudo demonstrou que baixas concentrações de E2 estimulam o desenvolvimento de receptores para ocitocina, já, altas concentrações não apresentam o mesmo efeito (LAMMING e MANN, 1995).

A P4 faz uma ligação de alta afinidade com os OTR endometriais, além de diminuir as concentrações de colesterol das membranas plasmáticas, diminuindo assim a estabilidade dos OTR (GIMPL e FAHRENHOLZ, 2001). A P4 assim, atuando como um modulador negativo do OTR, dificulta sua ação dela em tecidos alvos, como acontece durante a quiescência uterina induzida pela P4 (GRAZZINI *et al.*, 1998). Por outro lado, o aumento da secreção local de ocitocina ovariana e ativação do OTR levam a um aumento da produção de P4 na fase luteínica (KHANDAWOOD *et al.*, 1998).

A administração de E2 aumenta a expressão de OTR em diferentes tecidos, bem como atua sobre a secreção de ocitocina (RICHARD e ZINGG, 1995; NISSENSON *et al.*, 1978). O pico pré-ovulatório de E2 parece ter um efeito inibidor sobre os OTR durante os primeiros dias do ciclo estral (MANN e LAMMING, 2000). Bridges *et al.* (2005) observaram que a manipulação das concentrações de estradiol antes da ovulação alterou a expressão do OTR no endométrio uterino no d5 do ciclo estral.

Nos últimos dias do ciclo estral, a ligação da ocitocina aos seus receptores inicia a secreção pulsátil de PGF2 α que resulta em luteólise (FLINT e SHELDRIK, 1983). A ação da ocitocina na luteólise foi proposta por McCracken *et al.* (1999), os quais consideram a ocitocina o elemento responsável pela secreção pulsátil de PGF2 α precedente à luteólise. Segundo esses autores, próximo ao final da fase luteínica, ocorre inibição dos receptores de P4 na hipófise e endométrio, permitindo ação do E2, o qual estimula a neuro-hipófise a secretar pulsos de baixa concentração e alta frequência de ocitocina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local e animais experimentais

O estudo foi conduzido em Barra do Corda, localizado na Mesorregião Central do Estado do Maranhão, Brasil, a 5°30'21" de latitude sul e 45°14'34" de longitude oeste. Os animais experimentais eram mantidos em sistema extensivo de criação, em pastagem de capim Mombaça (*Megathyrus maximus*) e suplementação mineral e água *ad libitum*. Foram utilizadas 40 fêmeas

multíparas da raça Nelore (*Bos indicus*), lactantes, com idade média de $48,0 \pm 0,0$ meses, em anestro, com período pós-parto entre 35 e 60 dias, e escore de condição corporal (ECC) $3,0 \pm 0,0$ (MACHADO et al. 2008).

Os procedimentos experimentais adotados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Maranhão (CEUA-UFMA), sob o Protocolo nº 23115.014522/2020-37.

3.2 Delineamento experimental

O delineamento utilizado no estudo foi o delineamento em blocos casualizados (DBC), em arranjo fatorial 2x2, caracterizando quatro tratamentos, com dez repetições cada, o fator de blocagem foi o diâmetro folicular dos animais no dia da remoção do dispositivo de progesterona (D8 do protocolo).

Todas as vacas foram submetidas a protocolos de inseminação (IATF) e aleatoriamente designadas para grupos de acordo com o éster E2 (CE ou BE) e tratamento com eCG (eCG ou Sem-eCG), o delineamento utilizado foi blocos casualizados (DBC) em um arranjo fatorial 2 x 2 (Figura 1). Para agrupar as unidades experimentais em grupos ou blocos homogêneos baseados no potencial ovulatório, as fêmeas foram caracterizadas de acordo com o diâmetro do folículo dominante no momento da remoção do dispositivo P4 (D8; dia 48 da aplicação do protocolo) e alocadas em 4 tratamentos com 10 vacas cada.

3.3 Protocolo hormonal

Previamente ao início do experimento, todos os animais foram submetidos a exame clínico ginecológico e ultrassonografia transretal utilizando transdutor linear de 8,0MHz, sendo utilizados apenas animais com ausência de qualquer anormalidade do trato reprodutivo.

No dia 0 (D0) todas as fêmeas receberam um dispositivo intravaginal contendo 1 g de P4 (Sincrogest[®], Ourofino, São Paulo, Brasil) associado a 2mg de Benzoato de Estradiol (Estrogin[®], Farmavet, São Paulo, Brasil). No dia 8 (D8) os dispositivos intravaginais foram removidos e administrados 0,150 mg de D-cloprostenol (PGF2 α , Prolise[®], Arsa, Buenos Aires, Argentina) em todos os animais. Neste momento, as fêmeas foram bloqueadas, em dois grupos, para receberem ou não 400UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; SincroeCG[®], Ourofino, São Paulo, Brasil). Em seguida, as fêmeas foram novamente bloqueadas, e alocadas de acordo com o indutor da ovulação, sendo utilizado 1,0 mg de BE 24h após a remoção do dispositivo de P4 (D9) ou 1,0 mg de Cipionato de

Estradiol (CE; ECP[®], Zoetis Saúde animal, São Paulo, Brasil) na ocasião da remoção dos dispositivos (D8) (Figura 1), perfazendo os seguintes grupos:

- **Grupo CE** (n=10)
- **Grupo CE + eCG** (n=10)
- **Grupo BE** (n=10)
- **Grupo BE + eCG** (n=10)

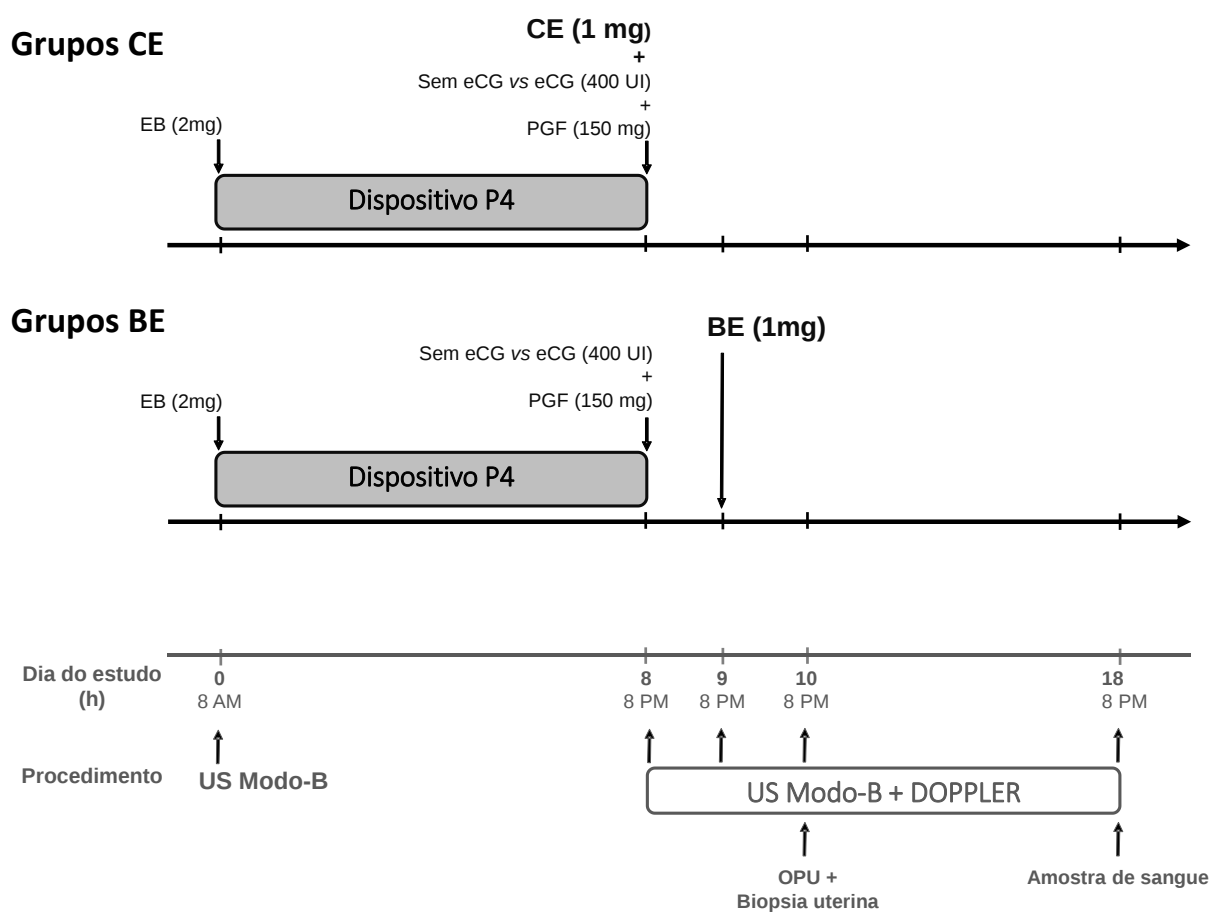


Figura 1. Representação esquemática do protocolo de IATF e procedimentos após a sincronização da ovulação em vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas ao protocolo de indução da ovulação baseado em CE ou BE, em associação ou não, com eCG. US B-mode = exame de ultrassom no modo bidimensional (escala de cinza); DOPPLER = exame de ultrassom no modo Doppler em cores; EC = cipionato de estradiol; EB = benzoato de estradiol; OPU = ovum pickup / aspiração de fluido folicular *in vivo* guiada por ultrassom.

3.4 Avaliações ultrassonográficas

Os animais foram submetidos a 5 avaliações ultrassonográficas nos dias 0, 8, 9, 10 e 18 do protocolo, realizadas com o auxílio de um aparelho de ultrassom (Mindray®, Modelo Z5Vet, multifrequencial linear transretal).

Inicialmente, foi realizada a avaliação no modo bidimensional (modo-B; escala de cinza), para identificar e mensurar as dimensões do útero, ovário e diâmetro do folículo dominante e do corpo lúteo. Em seguida, foi acionado o modo Color Doppler para determinar a área de perfusão sanguínea. As imagens em modo Color Doppler foram gravadas para avaliação posterior, foram utilizadas as imagens que evidenciaram maior área de perfusão sanguínea e com melhor qualidade. Para isso, foi realizado o escaneamento contínuo em tempo real durante 1 min, em corte transversal dos cornos uterinos e ovários (adaptado de FERREIRA *et al.*, 2008).

As imagens foram submetidas a avaliações subjetivas visuais por seis avaliadores experientes e não experientes, para prever a área de vascularização em cores proporcionalmente à área total de cada estrutura avaliada (0 a 100%, figura 2).

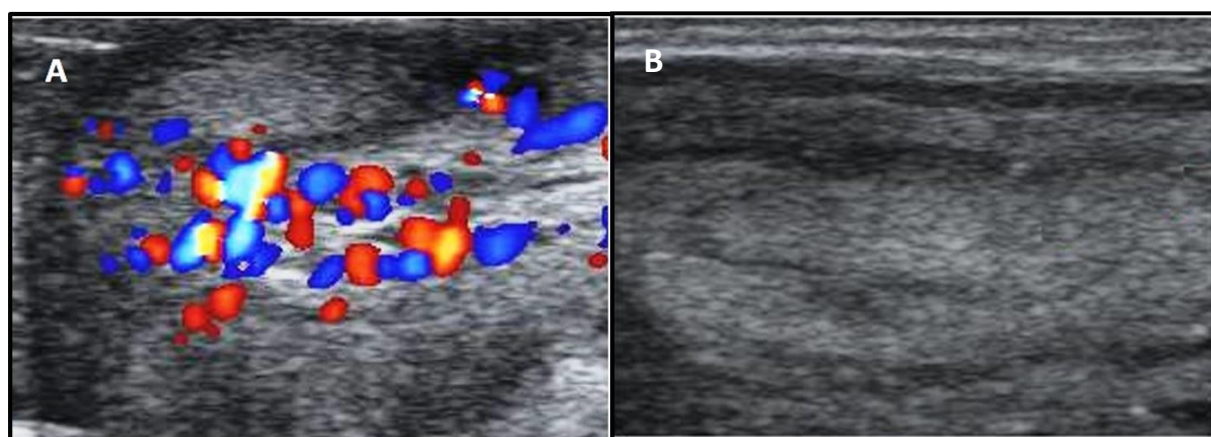


Figura 2. Ultrassonografia uterina mostrando fluxo sanguíneo em modo Doppler colorido (A) e a mesma estrutura em modo B (B).

As avaliações objetivas foram realizadas com base na intensidade em número de pixels coloridos nas imagens, como descrito para éguas e novilhas (SILVA *et al.*, 2005; GINTHER, 2007; GINTHER, 2009). A aferição da quantidade de pixels coloridos das imagens foi realizada com o auxílio de um programa de edição de imagem (Adobe Photoshop CS5, figura 3), que fornece em escala de pixels a extensão da vascularização dos cornos uterinos, ovários, parede folicular e corpo lúteo (SILVA e GINTHER, 2010).

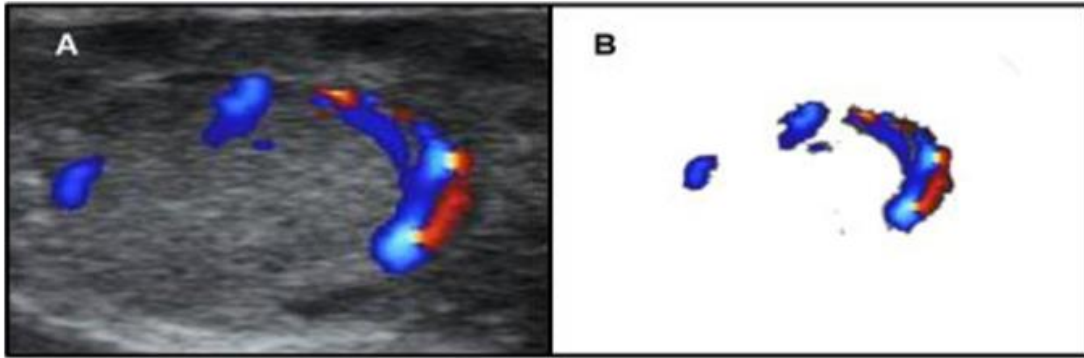


Figura 3. Imagem do CL no modo Color Doppler (A) e a mesma imagem editada pelo Adobe Photoshop CS5 para contagem de pixels coloridos (B).

3.5 Recuperação *in vivo* do Fluido Folicular

A aspiração do folículo dominante foi realizada ao final do protocolo de sincronização (D10) - que correspondeu ao dia da IATF.

Previamente à aspiração folicular, foi realizada a assepsia da região perineal com água e sabão e desinfetadas com iodo 10% e realizada a anestesia epidural com 5 mL de cloridrato de lidocaína (LIDOVET®, BRAVET, Brasil) a 2% e sedação com 1mL de acepromazina 1% IM (Acepran®, UNIVET, Brasil).

Para a recuperação *in vivo* de fluido folicular, foi realizada a aspiração do folículo dominante, com diâmetro médio 10 a 14 mm. As punções foram realizadas com o auxílio de ultrassom e um dispositivo-guia para agulha 10 gauge. O conteúdo folicular foi recuperado por aspiração, usando pressão negativa manual, via um circuito de Teflon (WTAVET®, Brasil) de 2mm de diâmetro interno e 80cm de comprimento, ligando a agulha diretamente a uma seringa de 10mL.

3.6 Biopsia uterina

Concomitantemente à aspiração folicular (D10), foi obtida amostra de endométrio uterino, retirada da região da curvatura média do corno uterino ipsilateral ao folículo ovulatório, com o auxílio de uma pinça Yomann por acesso transcervical. Em seguida, os fragmentos foram armazenados a -20°C em RNA Later (Ambion, Austin, Estados Unidos) até o processo de extração de RNAm, transcrição reversa e PCR em tempo real no laboratório.

3.7 Extração de RNAm Transcrição Reversa

O RNAm total foi extraído utilizando o Rneasy Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante e tratadas com Dnase. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria utilizando 1µL da amostra e um espectrofotômetro ND-100 (NanoDrop, Wilmington, USA). O RNAm foi retrotranscrito em cDNA utilizando-se o kit comercial Super Script III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), para uma reação de volume final de 20µL. Para a síntese foram utilizados 3,0 µL de água DEPC, 1,0µL de Random Hexâmero (50µg/µL), 1,0 µL de Anneling Buffer, 2,0 µL de RNase OUTTM Enzyme Mix, 10,0 µL de 2x First-Strand Reaction Mix. Os parâmetros utilizados para a síntese do cDNA foram: 65°C por 5 minutos, incubado em gelo por 1 minuto, 25°C por 10 minutos e 50°C por 50 minutos. Posteriormente, o cDNA foi submetido a PCR convencional para avaliar se a quantidade de RNA foi suficiente. Logo após a PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% para confirmar o tamanho do fragmento.

3.8 PCR em Tempo Real (RT-PCR)

A RT-PCR foi realizada utilizando-se 2,5 µL de cDNA, 10 µM do par de primers específico para cada gene e 12,5 µL de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix - with ROX, Invitrogen) em um volume final de 2 µL por reação. Os parâmetros utilizados para a RT-PCR foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, utilizando um termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems). Os dados foram analisados utilizando o método Ct comparativo (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Os valores de Ct foram normalizados com base na expressão de GAPDH. A sequência dos iniciadores utilizados está descrita no Quadro 1.

Quadro 1. Sequência dos genes e iniciadores utilizados na RT-PCR.

Gene	Tecido/função associada	Iniciadores (5'-3')	Sequência de referência no NCBI
GAPDH	Gene endógeno de referência	5'- GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG-3' 3'-CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA-5'	NM_001034034.1
PGR	Gene endometrial	5'-GCCGCAGGTCTACCAGCCCTA-3' 3'-GTTATGCTGTCCTTCCATTGCCCTT-5'	NM_001205356.1
VEGF	Gene endometrial	5'-GCCATGGAGCGCTTTGG-3' 3'-CCACAGTCAGCAATGGTGATCT-5'	NM_174216
OTR	Gene endometrial	5'-AAGATGACCTTCATCGTCGTG-3' 3'-CGTGAAGAGCATGTAGATCCAG-5'	NM_174134.2

3.9. Concentrações de estradiol (E2) e progesterona (P4) no líquido folicular e no plasma sanguíneo

Para determinação das concentrações séricas dos hormônios esteroides, P4 e E2, amostras de sangue foram coletadas por meio de punção da artéria ou veia coccígeas diretamente em tubos de vácuo de 10mL sem anticoagulante Vacutainer®, (Becton-Dickinson & Company) em temperatura ambiente após cada avaliação ultrassonográfica. Imediatamente após as colheitas, cada amostra foi centrifugada (3000g por 10 minutos; Centrífuga Excelsa Baby, Fanem®), e o soro obtido foi separado e estocado em tubos esterilizados e identificados a uma temperatura de -20°C. Para a determinação da concentração dos hormônios esteroides P4 e E2 no líquido folicular, as amostras foram diluídas em PBS para adequação à curva padrão do kit de quantificação utilizado, em virtude das elevadas concentrações de estradiol (diluição 1:100) e progesterona (diluição 1:50) no fluido folicular.

As análises foram realizadas pela técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se kits comerciais para determinação de progesterona e estradiol em fase sólida (Progesterone ELISA e 17beta-Estradiol ELISA kit, IBL International).

3.10. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS® (versão 9.4. SAS Inst. Inc., Cary, NY, EUA). A normalidade dos resíduos para cada

variável foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk (aplicativo PROC UNIVARIATE do SAS). Quando necessária, foi realizada a transformação dos dados (logaritmo na base 10 – $\text{Log}_{10} X$), de tal modo que esses atendessem às pressuposições da análise de variância. As variáveis dependentes contínuas (diâmetro folicular e eco pixels) foram expressas em média e erro-padrão da média (média $\pm$ EPM), analisadas por ANOVA e as médias entre os tratamentos comparadas pelo teste de Duncan (PROC GLM do SAS).

A taxa de ovulação foi verificada no D18, a partir da identificação do corpo lúteo formado após a luteinização do folículo dominante aspirado no D10 (Torres-Júnior et al., 2008), e analisada pelo teste exato de Fisher (GraphPad InStat®; Sampaio, 2002). As concentrações hormonais, área percentual de vascularização folicular e a expressão de cDNA para os genes PGR, VEGF e OTR apresentaram distribuição não normal; o modelo foi ajustado pela distribuição de Poisson e analisados por meio de regressão de Poisson (PROC GLIMMIX do SAS), baseado em Wang *et al.* (2014) e Svensson *et al.* (2019).

A relação entre as variáveis foi estudada pelo método de Análise de Componentes Principais (PCA), utilizando o software Statistica 7.1 (STATSOFT, 2007). De acordo com o método citado, os dois eixos produzidos graficamente representam o padrão mais forte dos dados, ou seja, explica a importância dos dois componentes principais sobre a variação total dos dados. O nível de significância adotado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, se considerou que houve efeito das variáveis classificatórias e das suas interações.

4. RESULTADOS

O diâmetro do folículo dominante e do corpo lúteo não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$). A taxa de ovulação foi significativamente maior nos animais submetidos ao tratamento CE+eCG do que aqueles submetidos ao CE ($P < 0,05$). Nos grupos tratados com BE, não houve efeito da eCG na taxa de ovulação, enquanto os grupos tratados com CE e CE+ eCG apresentaram taxa de ovulação intermediária ($P > 0,05$). No geral, não houve interação entre os indutores e a eCG (Indutor x eCG) nos diâmetros do FD e CL ou na taxa de ovulação (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos dos ésteres de estradiol (BE e CE) como indutores de ovulação e sua associação, ou não, com eCG, sobre a resposta folicular ovariana em vacas Nelore (*Bos indicus*) avaliadas por ultrassonografia nos dias 8, 9, 10 e 18 do protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF).[†]

Variáveis	BE		CE		P-valor		
	eCG	Sem eCG	eCG	Sem eCG	E2	eCG	E2 x eCG
n	10	10	10	10	-	-	-
Diâmetro FD no D8 (mm)	10.2±0.8	10.3±0.8	9.7±0.6	9.9±0.8	0.5273	0.8571	0.9521
Diâmetro FD no D9 (mm)	11.5±0.7	10.8±0.8	11.7±0.6	10.7±0.9	0.9071	0.2990	0.8914
Diâmetro FD no D10 (mm)	12.1±0.7	12.2±0.8	13.3±0.6	11.8±0.8	0.6058	0.4059	0.3047
Diâmetro CL no D18 (mm)	17.4±1.3	17.0±1.4	15.5±2.9	15.2±3.1	0.3290	0.3956	0.3936
Taxa de ovulação*	70% (7/10) ^{ab}	80% (8/10) ^{ab}	100% (10/10) ^a	50% (5/10) ^b	0.1000	0.2700	---

Protocolo de IATF [†]. Em dia aleatório do ciclo estral (Dia 0), as vacas receberam um dispositivo intravaginal P4 mais a administração de 2 mg de BE. No momento da retirada do dispositivo P4 (Dia 8) as vacas foram tratadas com 0,150 mg de D-cloprostenol (PGF) e divididas aleatoriamente para receber ou não 400 UI de eCG; bem como aleatoriamente designados para receber 1 mg de CE imediatamente (D8), ou 1 mg de BE, 24 horas após (D9).

* taxa de ovulação; caracterizada pela identificação do corpo lúteo no D18; analisada pelo teste exato de Fisher.

^{ab} Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si, com base no teste de Duncan, ao nível de significância de 5%..

BE= benzoato de estradiol; CE= cipionato de estradiol; eCG= gonadotrofina coriônica equina; FD=folículo dominante; CL=corpo lúteo.

Não houve diferença significativa na área de vascularização uterina no D8 ($P > 0,05$). No entanto, houve efeito da administração do CE e eCG, que aumentou significativamente a vascularização uterina, do D8 para o D9 ($P = 0,0006$) (Tabela 2).

O indutor da ovulação não influenciou na vascularização da parede do FD; entretanto, apresentou interação significativa com a eCG ($P < 0,05$). Esse achado mostrou que a melhor resposta vascular do indutor no presente estudo dependeu de sua associação com eCG e do seu tempo de administração (D8 para CE e D9 para BE) (Tabela 2).

As fêmeas tratadas com BE registraram maior taxa de área vascularizada tanto no CL ($P = 0,0192$) quanto no útero ($P = 0,0315$), no diestro após a aplicação do protocolo (D18). Por outro lado, não houve efeito ou interação da BE com a eCG ($P > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos dos ésteres de estradiol (BE e CE) como estimulante ovulatório e sua associação, ou não, com eCG, na vascularização uterina em vacas Nelore (*Bos indicus*) avaliadas por ultrassonografia com Doppler colorido nos dias 8, 9, 10 e 18 do protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF).[†]

Varáveis	BE		CE		P-valor		
	eCG	Sem eCG	eCG	Sem eCG	E2	eCG	E2 x eCG
n	10	10	10	10	-	-	-
Área de vascularização uterina no D8 (%)	9.8±0.9	11.9±1.0	12.3±1.1	11.9±1.0	0.2334	0.3958	0.2334
Área de vascularização uterina no D9 (%)	18.0.9±1.3 ^a	10.7±1.3 ^b	19.7±3.9 ^a	18.2±3.3 ^a	0.0006	0.0008	0.0117
Área de vascularização uterina no D10 (%)	16.3±1.3 ^{ab}	19.9±1.5 ^a	17.6±1.0 ^{ab}	15.5±1.2 ^b	0.2714	0.6443	0.0420
Área de vascularização uterina no D18 (%)	15.8±1.2 ^a	12.4±1.2 ^{ab}	11.4±1.1 ^b	11.5±1.1 ^b	0.0315	0.2120	0.1800
Área de vascularização FD no D8 (%)	12.1±1.1 ^b	11.6±1.0 ^b	16.9±1.3 ^a	8.7±0.9 ^c	0.8035	0.0005	0.0019
Área de vascularização FD no D9 (%)	15.5±1.2 ^a	10.7±1.0 ^b	10.9±1.0 ^b	12.8±1.1 ^{ab}	0.3461	0.2540	0.0058
Área de vascularização FD no D10 (%)	15.0±1.2 ^a	10.3±1.0 ^b	11.2±1.1 ^b	10.9±1.0 ^b	0.2231	0.0384	0.0740
Área de vascularização CL no D18 (%)	40.0±2.5 ^a	43.5±2.3 ^a	32.5±1.8 ^b	38.7±3.1 ^{ab}	0.0192	0.0549	0.4816

Protocolo de IATF [†]. Em dia aleatório do ciclo estral (Dia 0), as vacas receberam um dispositivo intravaginal P4 mais a administração de 2 mg de BE. No momento da retirada do dispositivo P4 (Dia 8) as vacas foram tratadas com 0,150 mg de D-cloprostenol (PGF) e divididas aleatoriamente para receber ou não 400 UI de eCG; bem como aleatoriamente designados para receber 1 mg de CE imediatamente (D8), ou 1 mg de BE, 24 horas após (D9).

^{abc} Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si pelo teste Duncan ao nível de significância de 5%.

BE= benzoato de estradiol; CE= cipionato de estradiol; eCG= gonadotrofina coriônica equina; FD=folículo dominante; CL=corpo lúteo.

Com base na análise dos efeitos principais dos tratamentos sobre os níveis hormonais, os animais tratados com CE apresentaram maior relação E2: P4 (Figura 4) no fluido folicular coletado na aplicação do protocolo D10 (folículo dominante pré-ovulatório). Surpreendentemente, essa associação foi menor nos grupos tratados com eCG. Por outro lado, o eCG teve efeito positivo no aumento da concentração de P4 no diestro subsequente (D18), principalmente quando associado à CE. As concentrações séricas de estradiol no D18 foram semelhantes entre si, independente do tratamento adotado ($P > 0,05$) (Figuras 2 e 5).

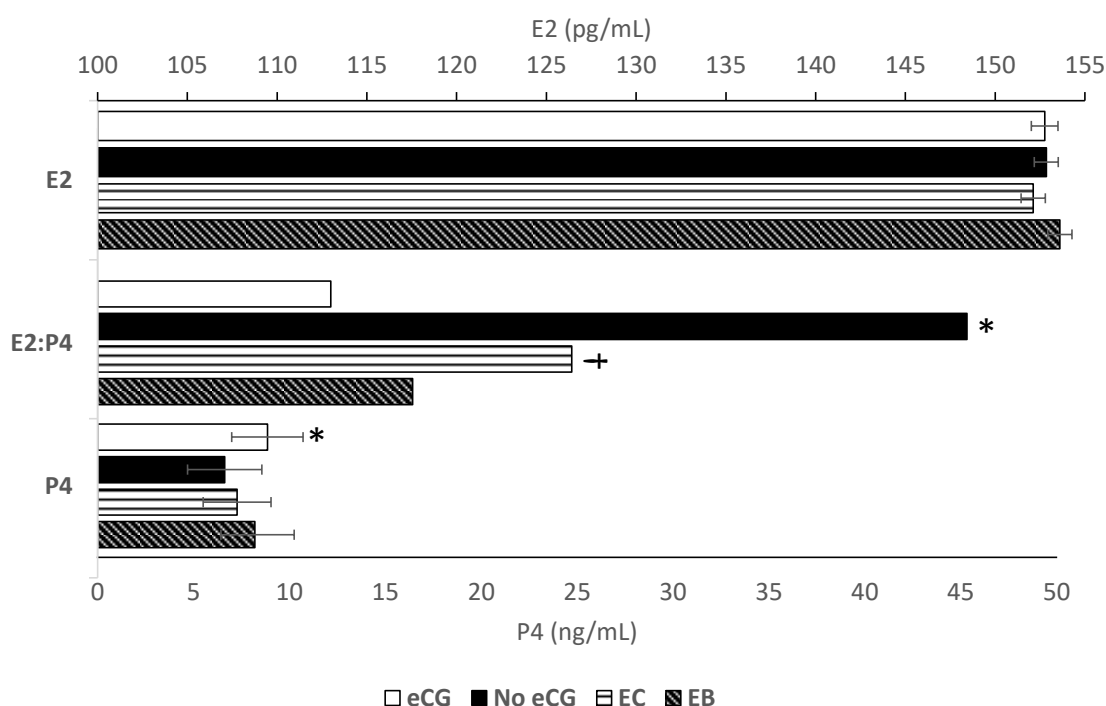


Figura 4. Efeitos principais da administração de éster de estradiol e eCG nas concentrações de P4 e E2 no soro sanguíneo (D18) e na razão E2: P4 no fluido folicular (D10) de vacas Nelore sincronizadas para IATF. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM.

* Diferença significativa entre eCG vs sem eCG ($P < 0,05$).

† Diferença significativa entre BE vs CE ($P < 0,05$).

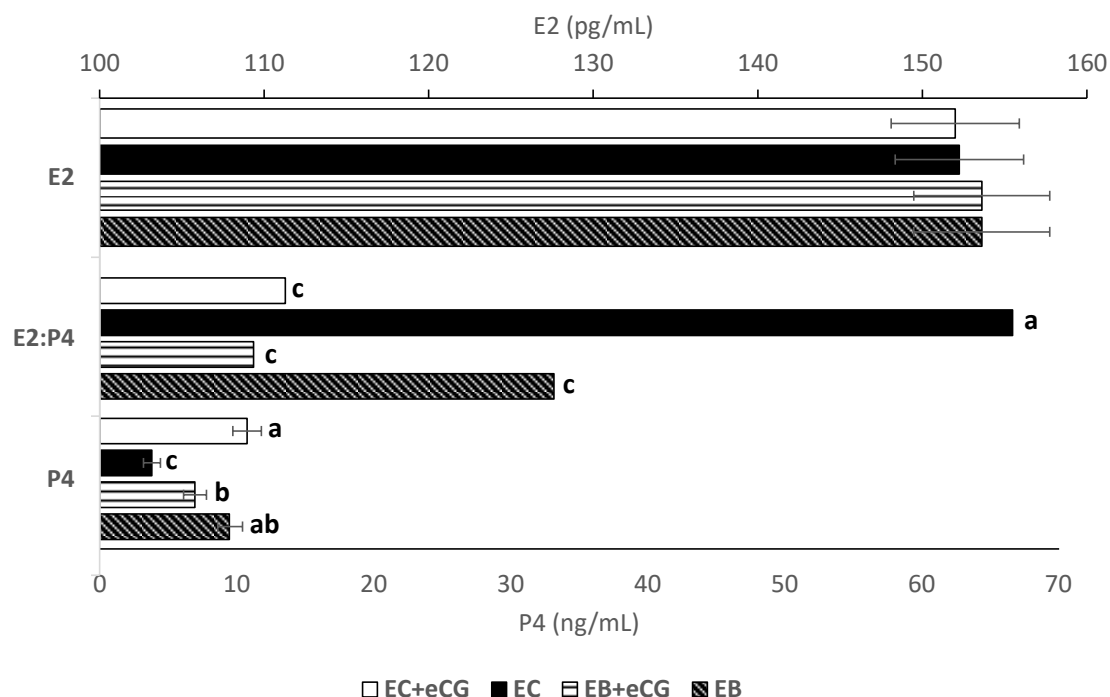


Figura 5. Efeitos dos tratamentos com BE e CE, em associação ou não, com eCG, nas concentrações séricas de P4 e E2 (D18) e na relação E2: P4 no fluido folicular (D10) de vacas Nelore sincronizadas para IATF. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM.

^{abc} Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

No geral, o BE promoveu maior expressão endometrial dos genes investigados ($P < 0,0001$; Figura 6). O indutor de ovulação e o eCG apresentaram efeitos isolados na expressão gênica do sistema VEGF, que foi significativamente maior nos animais tratados com BE ($P < 0,0001$) e eCG ($P < 0,0140$) (Figuras 6 e 7). Também houve alta expressão do gene OTR no grupo tratado com BE ($P < 0,0001$), embora sua expressão tenha sido menos evidente nos animais tratados com eCG. O grupo CE + eCG apresentou a menor expressão de OTR entre os tratamentos (Figuras 6 e 7). A expressão do gene PGR também foi significativamente maior nos grupos tratados com BE ($P < 0,0001$) e o uso de eCG influenciou positivamente na expressão desse gene, independente do indutor ($P < 0,0001$). Esse achado mostrou que o aumento da expressão do PGR depende do uso da eCG em associação com indutores ($P = 0,0002$) (Figuras 6 e 7).

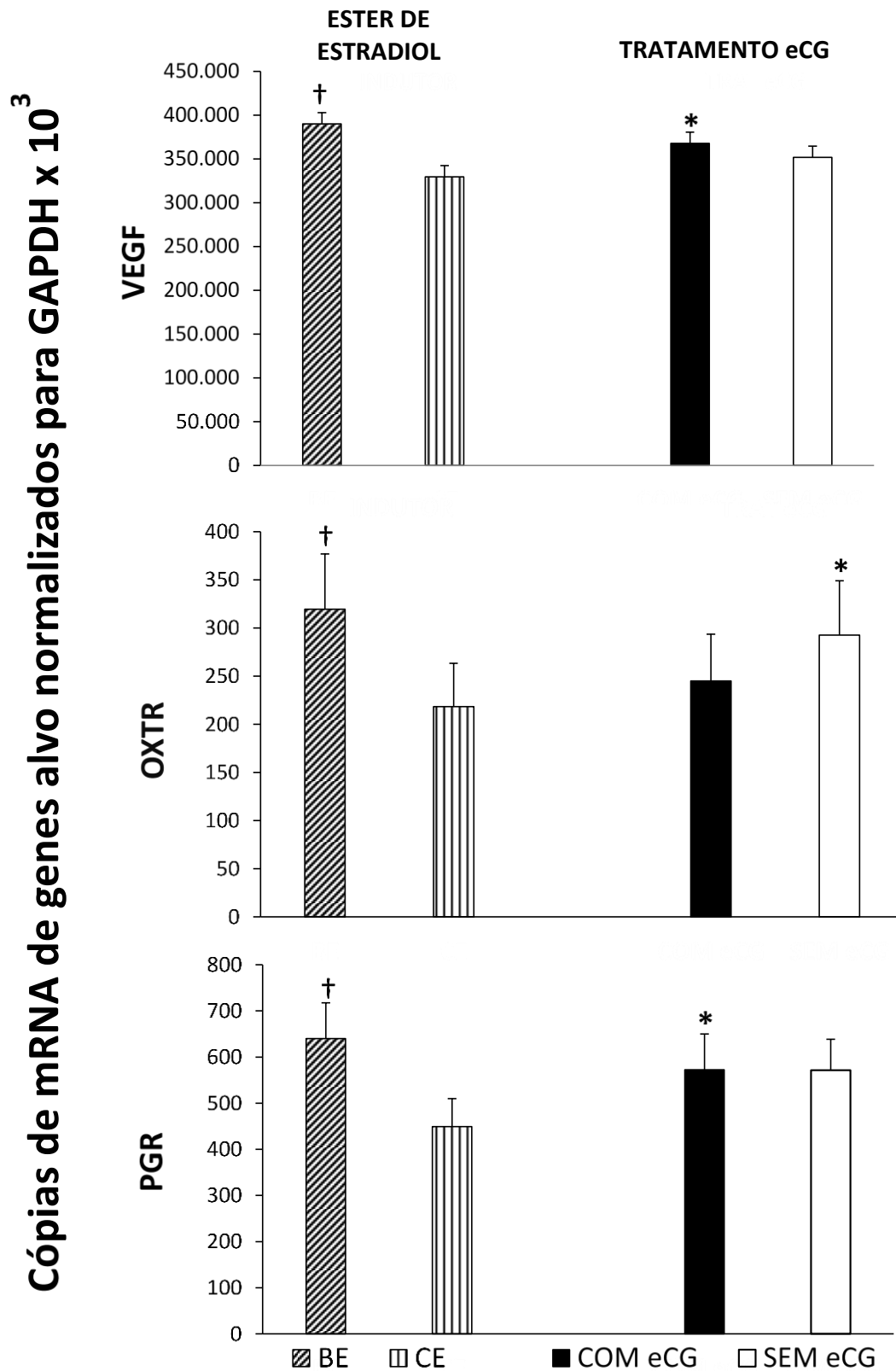


Figura 6. Efeitos principais da administração de éster de estradiol e eCG na expressão endometrial de VEGF, OXTR e PGR no dia dez (D10) da aplicação do protocolo em vacas Nelore sincronizadas para IATE. Os valores são expressos como média ± EPM.* Diferença significativa entre eCG vs sem eCG ($P < 0,05$).† Diferença significativa entre BE vs CE ($P < 0,05$).

Cópias de mRNA de genes alvo normalizados para GAPDH x 10³

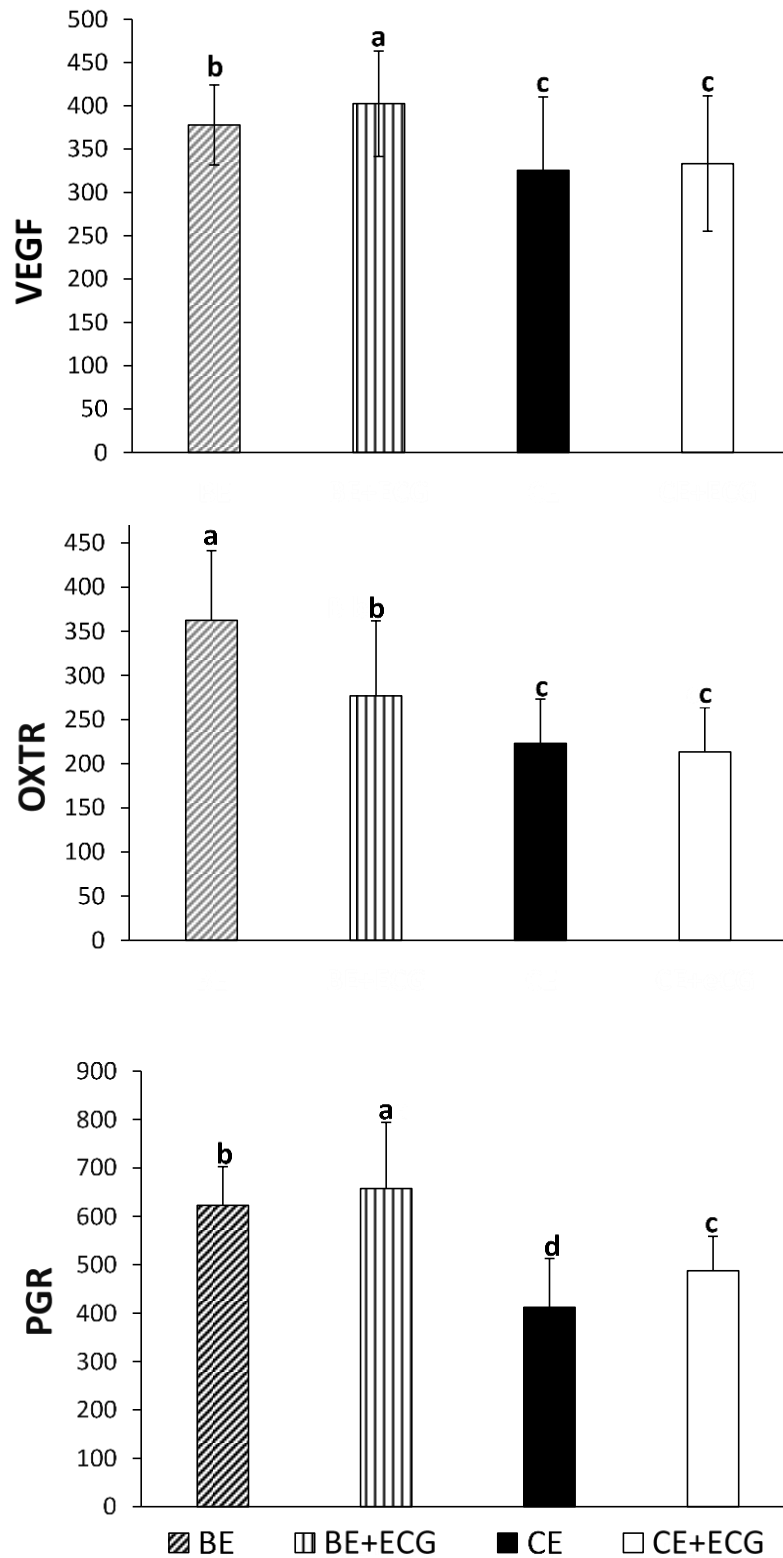


Figura 7. Efeitos dos tratamentos com BE, BE + eCG, CE ou CE + eCG na expressão endometrial de VEGF, OXTR e PGR no dia dez (D10) de aplicação do protocolo em vacas Nelore sincronizadas para IATF. Os valores são expressos em média $\pm$ EPM..

^{abc} Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (P < 0,05).

A relação entre as variáveis analisadas por meio da ultrassonografia Modo B, Doppler colorido útero-ovariano, concentração sérica de esteroides ovarianos e expressão gênica uterina foi investigada por meio da Análise de Componentes Principais (PCA) (Figura 8). Os resultados mostraram que os dois componentes principais, em conjunto, explicaram 40,21% da variação total dos dados. Taxa de ovulação (OVU), OXTR e PGR foram as variáveis mais representativas no Componente 1, por apresentarem vetores de maior comprimento e mais próximos do eixo do Componente 1. A vascularização do FD (FDV) e a concentração folicular E2 (E2) foram as variáveis que mais contribuíram para o Componente 2; eles foram altamente relacionados entre si, mas não foram relacionados a OXTR e PGR. A expressão do VEGF e a vascularização do útero (VUT) mostraram forte relação entre si, uma vez que formaram ângulos agudos entre seus respectivos vetores, conforme mostrado na Figura 8.

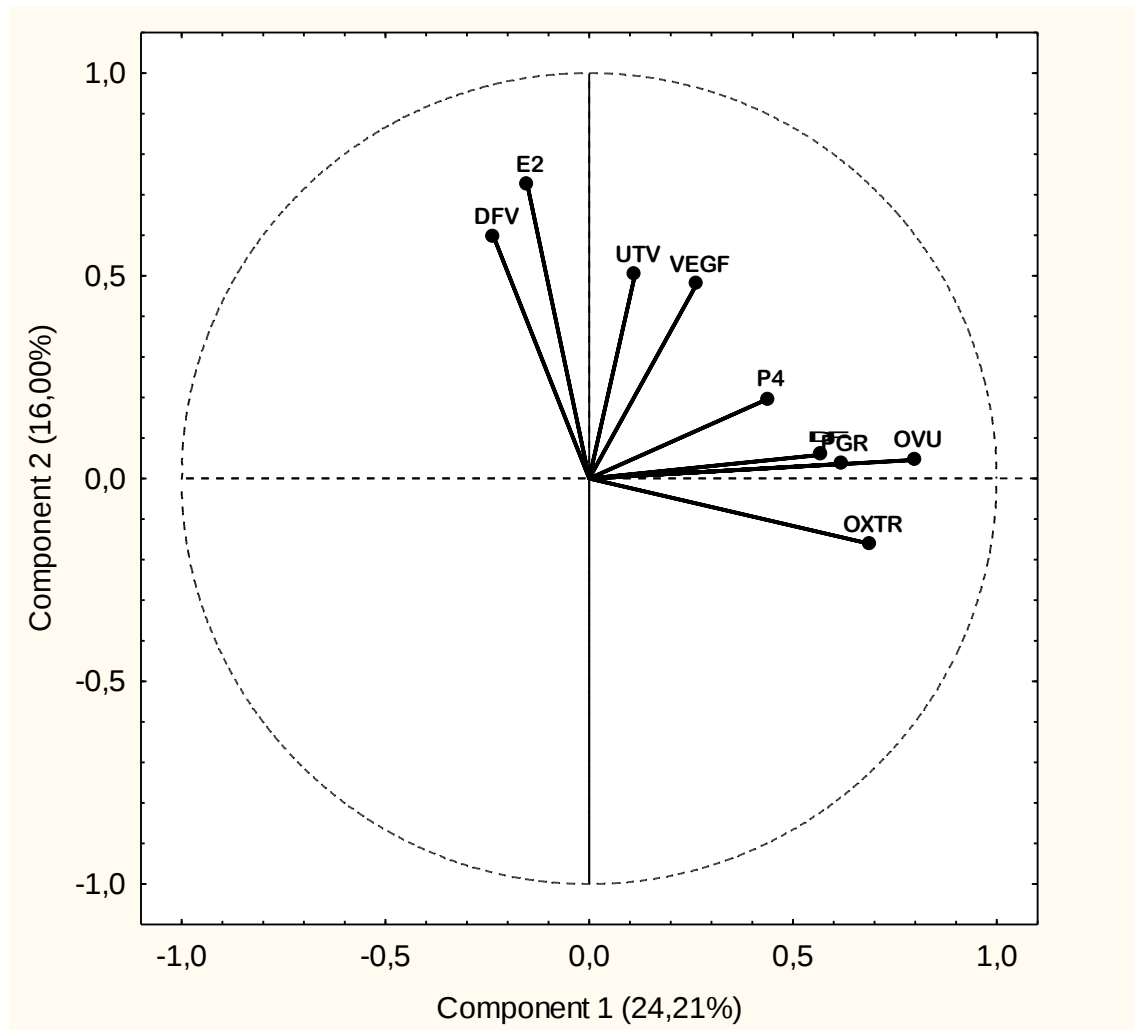


Figura 8. Biplot de Análise de Componentes Principais (PCA) aplicado à relação entre variáveis, obtidas por ultrassonografia modo B e Doppler, concentrações de esteróides sexuais no fluido folicular e expressão gênica uterina em vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas a protocolo de sincronização com diferentes ésteres de estradiol e uso da eCG. OVU = taxa de ovulação; DF = diâmetro do folículo dominante; DFV = vascularização do folículo dominante; UTV = vascularização uterina; E2 = concentrações de estradiol no fluido folicular; P4 = concentração de progesterona no fluido folicular; VEGF = expressão endometrial do gene fator de crescimento endotelial vascular; OXTR = expressão endometrial do gene receptor de oxitocina; PGR = expressão endometrial do gene receptor de progesterona.

5. DISCUSSÃO

Embora o presente estudo não tenha encontrado diferença no diâmetro folicular entre os grupos experimentais, o uso de indutores associados a eCG influenciou na maior taxa de ovulação observada no grupo CE + eCG (100%).

Este resultado já era esperado, uma vez que muitos outros estudos mostraram que a eCG leva ao aumento da taxa de concepção por tornar o pico pré-ovulatório de LH mais consistente, bem como aumenta a responsividade dos folículos dominantes aos indutores de ovulação e aumenta a taxa de ovulação, principalmente em animais em anestro (BARUSELLI *et al.*, 2003; BARUSELLI *et al.*, 2004a; BARUSELLI *et al.*, 2004b; SILVA *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2004; PENTEADO *et al.*, 2004; MARQUES *et al.*, 2005; BARUSELLI *et al.*, 2006; SALES *et al.*, 2010; SÁ FILHO *et al.*, 2011; NUNEZ-OLIVERA *et al.*, 2014). Além disso, segundo Sá Filho *et al.* (2017), o CE é responsável por aumentar a incidência de estro e melhores taxas de prenhez após IA do que BE.

Esses resultados mostraram que, apesar da divergência de informações sobre a capacidade de sincronização das ovulações induzidas pela administração de CE no momento da retirada do dispositivo P4, o uso desse indutor de ovulação resultou em taxas de concepção semelhantes ou melhores que as registradas para BE, em procedimentos de inseminação realizados 48h (SALES *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2018), entre 52 e 56h (AYRES *et al.*, 2006) e entre 54 e 58h (PENTEADO *et al.*, 2006) após a retirada da P4. Esse resultado foi observado principalmente quando a CE foi utilizada em associação com a eCG, que melhorou a sincronização e luteinização, além de estimular o desenvolvimento folicular (PEREIRA, 2011).

Assim, a administração do CE no dia da remoção do dispositivo P4 (protocolo de três manejos; TORRES-JÚNIOR *et al.*, 2014) tem sido amplamente utilizada para substituir o BE como indutor de ovulação, sem comprometer os índices registrados para protocolos a base de progesterona mais eCG. Assim, o CE é uma alternativa para simplificar os programas de sincronização, pois permite reduzir o número de vezes que os animais necessitam ser manejados sem afetar a eficácia do tratamento de sincronização, principalmente em grandes rebanhos (PENTEADO *et al.*, 2006; AYRES *et al.*, 2006; CASTRO -JÚNIOR *et al.*, 2008; CREPALDI, 2009).

A vascularização endometrial é um fator importante na receptividade uterina ao feto (BAZER *et al.*, 2012). Neste estudo, o percentual de área uterina vascularizada (%) dos animais apresentou variação entre os tratamentos 24 horas após a retirada do implante de P4 (D9). Pode ter acontecido devido à diminuição da concentração de P4 após a retirada do dispositivo P4 e à exposição sequencial dos animais ao E2, que levou à vasodilatação e, consequentemente

aumento do fluxo vascular uterino (FAZLEABAS e STRAKOVA, 2002). Outro estudo recente mostrou que vacas leiteiras submetidas a administração de 10 mg de estradiol (BE) intramuscular no pós-parto, avaliadas com ultrassom Doppler colorido, apresentaram aumento do volume e da velocidade do fluxo sanguíneo e também no diâmetro das artérias uterinas (RAWY *et al.*, 2018).

A ação da eCG no aumento do fluxo sanguíneo uterino também foi notável no presente estudo, principalmente quando associada ao BE. A utilização de gonadotrofinas como o FSH e hCG ou eCG, em protocolos de IATF, aumentam as concentrações de estradiol folicular (PRICE *et al.*, 1999), e o estradiol age como vasodilatador importante na artéria uterina (FORD, 1982; GREISS e ANDERSON, 1970). Além disso, outros estudos correlacionaram positivamente o aumento no fluxo sanguíneo uterino com os níveis de estrógeno durante o estro em vacas (ROMAN-PONCE *et al.*, 1978; FORD e CHENAULT, 1981; BOLLWEIN *et al.*, 2000). Honnens *et al.* (2008) observaram aumento no volume de fluxo sanguíneo e diminuição no índice de pulsatilidade da artéria uterina em um estudo com vacas submetidas ao tratamento de superovulação com gonadotrofinas.

Animais tratados com um dos ésteres de estradiol, seja com benzoato ou cipionato, não apresentaram alterações no padrão vascular sanguíneo do FD, quando não foram submetidos à administração concomitante de eCG. Porém, cada indutor de ovulação, utilizado em associação com eCG, induziu aumento do fluxo vascular no FD, no respectivo dia de administração (CE no D8 e BE no D9). O grupo tratado com BE apresentou aumento permanente da vascularização do D9 ao D10; este resultado foi provavelmente influenciado pelo aumento das concentrações intra-foliculares de E2 neste grupo em comparação ao grupo tratado com CE. Pode ter acontecido em resposta ao aumento da biodisponibilidade farmacológica da BE. Vynckier *et al.* (1990) observaram rápido aumento no nível de E2 no plasma sanguíneo de vacas Holandesas tratadas com 10 mg de BE; o nível máximo de E2 foi registrado entre 1 e 23 horas após a aplicação do BE. Por outro lado, esses mesmos autores observaram posteriormente picos de concentração plasmática de E2, após a administração de CE. Resultado semelhante foi relatado por Sales *et al.* (2012), que observaram pico de LH aproximadamente 30 horas após a administração de CE e área sob a curva duas vezes mais persistente em comparação com o BE ($8,6 \pm 0,2$ vs $16,5 \pm 1,0$; $P < 0,05$) (SALES *et al.*, 2012).

A vascularização sanguínea na margem do folículo durante o proestro e o estro é bastante discreta, e apresenta fluxo sanguíneo visivelmente aumentado aproximadamente 6 horas antes do início do pico de LH (MATTIOLI *et al.*, 2001). Curiosamente, Ginther (2007) mostrou que o Doppler colorido não detecta sinais de fluxo sanguíneo em folículos que não ovulam, mesmo que tenham diâmetro pré-ovulatório. Este resultado indica o potencial da

ferramenta Color-Doppler para avaliar o fluxo sanguíneo em folículos dominantes em protocolos IATF, desde que os efeitos vasculares inerentes ao tempo de administração, dose e éster de estradiol usados para induzir a ovulação também sejam levados em consideração no momento da interpretação do teste (BOLLWEIN *et al.*, 2000). A parede do folículo ovulatório colaba durante a ovulação. Além disso, fatores angiogênicos e mitogênicos, como fator de crescimento semelhante à insulina, fator de crescimento de fibroblastos e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) sob influência de LH, levam ao crescimento e vascularização do corpo lúteo (MCCRACKEN *et al.*, 1999). Os grupos tratados com BE formaram CLs mais vascularizados no diestro após a aplicação do protocolo (D18). Isso pode ter acontecido devido à maior expressão do gene VEGF nesse grupo.

A correlação positiva entre a vascularização do CL e a produção de P4 foi previamente descrita por Arruda (2001) e Ginther *et al.* (2008). No entanto, o uso de eCG no presente estudo aumentou as concentrações de P4, mas não influenciou na vascularização do CL. Por outro lado, o grupo tratado com BE apresentou maior número de CLs vascularizados, mas não apresentou aumento das concentrações de P4. Além disso, é importante enfatizar que, apesar dos diferentes padrões de vascularização do CLs observados entre os ésteres de estradiol, seu diâmetro permaneceu inalterado.

De acordo com Bollwein *et al.* (2002), não houve associação entre o diâmetro do CL e alterações no fluxo sanguíneo. Esse resultado sugere que o processo de neovascularização do CL não está associado à sua dimensão. O fluxo sanguíneo aumentou em paralelo com o aumento da concentração de progesterona circulante no estágio inicial de desenvolvimento do CL; assim, a vascularização foi associada ao potencial de produção de progesterona (ACOSTA *et al.*, 2003).

Como no CL, a vascularização uterina no D18 (diestro) foi significativamente maior no grupo BE; portanto, não seguiu o padrão de correlação negativa esperado frequentemente observado entre ambos. A presença de CL influencia índices de resistência (IR) e pulsatilidade (IP) uterinos, que costumam ser maiores em animais sem CL, indicando menor perfusão sanguínea (WILTBANK, 1994; GINTHER *et al.*, 2007). Resultados semelhantes foram observados por Rawy *et al.* (2018) em estudo realizado com vacas leiteiras submetidas à aplicação 10 mg de BE intramuscular no pós-parto, avaliadas com auxílio de ultrassom Doppler colorido, observaram aumento do volume e velocidade do fluxo sanguíneo e do diâmetro da artéria uterina.

De acordo com Hervé *et al.* (2006), a variabilidade na expressão do sistema VEGF está associada a alterações funcionais no útero e ovários dos animais. Entre os fatores responsáveis pelo aumento da expressão de VEGF, encontram-se os hormônios esteróides ovarianos (Hyder,

2002) e as prostaglandinas (GATELY, 2000). A expressão de VEGF no diestro após a aplicação do protocolo no presente estudo foi significativamente maior em animais tratados com BE, e também pode explicar a maior vascularização uterina observada ao mesmo tempo. Portanto, os efeitos vasculares da P4 resultaram de sua ação estimulatória na produção de VEGF (SONE *et al.*, 1996; HYDER *et al.*, 1998; SHIKAWA, 2003; ROBINSON *et al.*, 2007). O VEGF é altamente mitogênico para células endoteliais (KAMAT *et al.*, 1995). Essa proteína é responsável por induzir a proliferação, maturação e migração de células endoteliais, bem como por inibir a apoptose. O VEGF regula a angiogênese, a permeabilidade dos vasos sanguíneos (NEUFELD, 2000), bem como o desenvolvimento vascular sob condições normais (CAO *et al.*, 1998; FRASER *et al.*, 2000) e condições patológicas (DVORAK *et al.*, 1991).

Além disso, o grupo BE + eCG apresentou maior expressão de VEGF, o que permitiu inferir que os efeitos do tratamento estimulador com eCG alteraram a expressão gênica no útero em curto prazo e, conseqüentemente, modularam o padrão de perfusão sanguínea. A expressão de VEGF também pode ser regulada por hormônios esteróides ovarianos (HYDER, 2002), prostaglandinas (GATELY, 2000), FSH (PAPA *et al.*, 2007), hCG (FILICORI *et al.*, 2005) ou pela própria eCG (SHIMIZU *et al.*, 2002), embora eCG não tenha influenciado na expressão de VEGF no grupo tratado com CE.

O grupo EB também registrou maior expressão do gene OXTR, apesar de apresentar relação E2: P4 menor do que os animais tratados com CE. No entanto, o grupo BE registrou maior concentração absoluta de E2 no fluido folicular do que o grupo CE ($1.637,50 \pm 14,3$ vs $1.500,00 \pm 12,3$; $P < 0,05$). As variações periovulatórias de E2, bem como sua inter-relação com P4, são conhecidas por estimular as contrações endometriais mediadas por ligações aumentadas de oxitocina ao seu receptor (MCCRAKEN *et al.*, 1999; ROBINSON *et al.*, 2001; DE FÁTIMA *et al.*, 2013).

O gene PGR foi mais expresso quando a eCG foi utilizada nos protocolos. Esse achado está relacionado com a concentração mais alta de P4 encontrada tanto no fluido folicular (D10) quanto no soro sanguíneo (D18). De acordo com Souza *et al.* (2009), a eCG promove o aumento do número de células luteais, que são responsáveis por aproximadamente 80% da síntese de P4 e conferem a ela maior volume e capacidade esteroidogênica. Assim, Baruselli *et al.* (2000) apontou o uso da eCG como uma ferramenta potencial para melhorar as concentrações plasmáticas de P4 em ciclos estrais subsequentes ao protocolo IATF.

Esses dados mostraram a eficácia da eCG em aumentar as taxas de ovulação, bem como CL e volume P4 circulante no diestro após o protocolo de IATF - essas condições são essenciais para a formação e sobrevivência embrionárias (BARUSELLI *et al.*, 2003; BARUSELLI *et al.*, 2004a; BARUSELLI *et al.*, 2004b; SILVA *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2004;

PENTEADO *et al.*, 2004; MARQUES *et al.*, 2005; SALES *et al.*, 2010; SÁ FILHO *et al.*, 2011; NUNEZ-OLIVERA *et al.*, 2014).

6. CONCLUSÃO

Concluiu-se que, os diferentes ésteres de estradiol e a administração de eCG regulam diferencialmente a vascularização, esteroidogênese e expressão gênica útero-ovariana em vacas *Bos indicus* submetidas a protocolos de IATF.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v. 125, p. 759–767, 2003.
- ACOSTA, T. J.; YOSHIZAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 651–658, 2002.
- ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Anim Reprod Sci**, v.82/83, p.127-140, 2004.
- ALBUQUERQUE, F. T.; FILHO, J. B. B.; VIANA, J. H. M. **Manipulação do ciclo estral em bovinos de corte: bases anatômicas fisiológicas e histológicas da reprodução da fêmea**. Lavras (MG): UFL – Departamento de Medicina Veterinária, 2004.
- ALLRICH, R. D. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2738-2744, 1994.
- AMBROSE, D.J.; RAJAMAHENDRAN, R.; KASTELIC, J.P.; SMALL, J.A. Synchronization of ovulation and conception rates in Holstein heifers given an intravaginal progesterone-releasing device (CIDR), and estradiol cypionate, porcine LH or gonadotropin releasing hormone. **Archiv Tierzucht**, v.44, p.77-79, 2001.
- ANDRADE, B.H.A.; FERRAZ, P.A.; RODRIGUES, A.S.R.; LOIOLA, M.V.G.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO-FILHO, A.L. Eficiência do cipionato de estradiol e do benzoato de estradiol em protocolos de indução da ovulação sobre a dinâmica ovariana e taxa de concepção de fêmeas nelore inseminadas em diferentes momentos. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n. 4, p. 70-82, 2012.
- ARRUDA, R. A.; VISINTIN, J. A.; FLEURY, J. J.; GARCIA, A. R.; MADUREIRA, E. H.; CELEGHINI, E. C. C.; NEVES NETO, J. R. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em, receptoras de embriões equinos? **Brazilian Journal of Veterinary Animal Science**, v. 38, p. 233-239, 2001.
- ARTAC, R. A.; MCFEE, R. M.; SMITH, R. A.; BALTES-BREITWISCH, M. M.; CLOPTON, D. T.; CUPP, A. S. Neutralization of vascular endothelial growth factor antiangiogenic isoforms is more effective than treatment with proangiogenic isoforms in stimulating vascular development and follicle progression in the perinatal rat ovary. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 5, p. 978-988, 2009.
- ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Estatísticas de evolução de venda de sêmen**, 2003.
- ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Relatório técnico Anual**, 2007.
- ASSEY, R.J.; HYTTEL, P.; PURWANTARA, B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles during the first follicular wave in cattle. **Theriogenology**, v.39, p.183-198, 1993.

AYRES, H.; PENTEADO, L.; TORRES - JUNIOR, J. R. S.; SOUZA, J. R.; BARUSELLI, P. S. Taxa de concepção de vacas Nelore lactantes sincronizadas com implante auricular de progestágeno associado ao benzoato ou ao cipionato. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p.410, 2006.

BARTOL, F. F.; WILEY, A. A.; COLEMAN, D. A.; WOLFE, D. F.; RIDDELL, M. G. J. Ovine uterine morphogenesis: effects of age and progestin administration and withdrawal on neonatal endometrial development and DNA synthesis. **Animal Science**, v. 66, n.11, p.3000-3009, 1988.

BARTOL, F. F.; WILEY, A. A.; FLOYD, J. G.; OTT, T. L.; BAZER, F. W.; GRAY, C. A.; SPENCER, T. E. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 54 p. 287-302.1999.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; VALENTIM, R.; BERBER, R. C. A.; CARVALHO FILHO, A. F.; MADUREIRA, E. H.; COSTA NETO, W. P. Dinâmica folicular em novilhas receptoras de embrião bovino submetidas à sincronização da ovulação para inovulação em tempo fixo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, p. 217, 2000.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; NASSER, L. F. T.; SILVA, R. C. P; MENEGATTI, J. A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I. C. C. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas Nelore (*Bos indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 244-245, 2003.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BO, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 479-486, 2004a.

BARUSELLI, P.S., REIS, E.L., CARVALHO, N.A.T., CARVALHO, J.B.P. eCG increases ovulation rate and plasmatc progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: Proceedings of the XIV International Congress on Animal Reproduction, vol. 1, Porto Seguro, BA, p. 117, 2004b.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F. T.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BO, G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle **Theriogenology**, v. 65, p.77-88, 2006.

BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. D. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 205-211, 2007.

BARUSELLI, P. S.; JACOMINI, J. O.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, v. 3, p. 146-167, 2008.

BARUSELLI, P. S.; SALES J. N. S.; SALA R. V.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 139-152, 2012.

BAZER, F. W.; SONG, G.; THATCHER, W. W. Roles of Conceptus Secretory Proteins in Establishment and Maintenance of Pregnancy in Ruminants. **Asian-Australas J Anim Sci**. 25 (1), 1–16, 2012.

BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: MADUREIRA E. H.; BARUSELLI, P. S. Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes, p. 99-114, São Paulo: FUNVET, 2001.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1451-1463, 2001.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for self-pointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53-72, 2002.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MATINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307-326, 2003.

BOLLWEIN, H.; MAIERL, J.; MAYER, R.; STOLLA, R. Transrectal color Doppler sonography of the A. uterine in cyclic mares. **Theriogenology**, v.49, p.1483–1488, 1997.

BOLLWEIN, H.; MAIERL, J.; MAYER, R.; STOLLA, R. Transrectal color Doppler sonography of the A. uterina in cyclic mares. **Theriogenology**, v. 49, p. 1483-1488, 1998.

BOLLWEIN, H.; MEYER, H. H. D.; MAIERL, J.; WEBER, F.; BAUMGARTNER, U.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 53, p. 1541-1552, 2000

BOLLWEIN, H.; BAUMGARTNER, U.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. **Theriogenology**, v. 57, p. 2053–2061, 2002.

BOOS, A.; MEYER, W.; SCHWARZ, B. R.; GRUNERT, A. E. Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 44, n. 1, p. 11-21, 1996.

BRANNSTROM, M.; ZACKRISSON, U.; HAGSTROM, H.; JOSEFSSON, B.; HELLBER, P.; GRANBERG. S.; COLLINS, W. P.; BOURNE, T. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. **Fertility and Sterility**, v. 69, p. 435-442, 1998.

BRATTA, F. G.; CECI, O.; LOIZZI, P. Combined intra-uterine and cervical pregnancy treated successfully with methotrexate. Int **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 53, n. 2, p. 173174, 1996.

BURKE, C. R.; DAY, M. L.; BUNT, C. R.; MACMILLAN, K. L. Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. **Journal of animal science**, v. 78, p. 145-151, 2000.

CAO, Y.; LINDEN, P.; FARNEBO, J.; CAO, R.; ERIKSSON, A.; KUMAR, V.; QI, J. H.; CLAESSION-WELSH, L.; ALITALOS, K. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 14389-14394, 1998.

CARSON-JURICA, M. A.; SCHRADER, W. T.; O'MALLEY, B. W. Steroid receptor family: structure and functions. **Endocrine Reviews**, v. 11, n. 2, p. 201-220, 1990.

- CARVALHO, C.F.; CHAMMAS, M.C.; CERRI, G.G. Princípios físicos do Doppler em ultrassonografia. **Ciência Rural**, v. 38, p. 872-879, 2008.
- CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.
- CARVALHO, N. A. T.; SOARES, J. G.; SOUZA, D. C.; MAIO, J. R. G.; SALES, J. N. D. S.; JÚNIOR, B. M.; BARUSELLI, P. S. Ovulation synchronization with estradiol benzoate or GnRH in a timed artificial insemination protocol in buffalo cows and heifers during the nonbreeding season. **Theriogenology**, v. 87, p. 333-338, 2017.
- CASTILHO, C.; GARCIA, J. M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G. P.; BRITO, L. F. C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first postovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 189-196, 2006.
- CASTRO JÚNIOR, J. D.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; BARUSELLI, P. S. Efeito do tratamento com diferentes indutores da ovulação (cipionato e benzoato de estradiol) e do momento da inseminação artificial (48 e 54h após a retirada do implante de norgestomet) na taxa de prenhez de vacas nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36 p. 617, 2008.
- CAVALIERI, J.; RUBIO, I.; KINDER, J. E.; ENTWISTLE, K. W.; FITZPATRICK, L. A. Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v.47, p. 801-814, 1997.
- COLLINS, W.; JURKOVIC, D.; BOURNE, T.; KURJAK, A.; CAMPBELL, S. Ovarian morphology, endocrine function and intra-follicular blood flow during the periovulatory period. **Human Reproduction**, v. 6, p. 319–324, 1991.
- CREPALDI, G.A.; SALES, J.N.S.; GIROTTO, R.W. et al. Momento da ovulação e taxa de concepção de vacas nelore tratadas com cipionato ou benzoato de estradiol para induzir a ovulação em protocolos de IATF. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 464, 2008.
- CREPALDI, G.A. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**. 2009. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- DE SILVA, A.W.M.V.; ANDERSON, G.W.; GWAZDAUSKAS, F.C.; MCGILLIARD, M.L.; LINEWEAVER, J.A. Correlations with estrous behavior and conception in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.64, p.2409-2418, 1981.
- DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v.55, p.1211-1239, 2001.
- DVORAK, H. F.; SIOUSSAT, T. M.; BROWN, L. F.; BERSE, B.; NAGY, J. A.; SOTREL, A.; MANSEAU, E. J.; VAN DE WATER, L.; SENGHER, D. R.; Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. **Journal of experimental medicine**, v.174, n. 5, p. 1275-1278, 1991.

FATIMA, L. A.; BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; BINELLI, M.; RENNO, F. P.; MURPHY, B. D.; **et al.** Global gene expression in the bovine corpus luteum is altered after stimulatory and superovulatory treatments. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 07, p. 998-1001, 2013.

FAZLEABAS, A. T.; STRAKOVA, Z. Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 186, p. 143-147, 2002.

FENGL, H.C.; BHAVE, M.; FAIRCLOUGH, R..J. Regulation of oxytocin receptor gene expression in sheep: tissue specificity, multiple transcripts and mRNA editing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.120, p. 187–200, 2000.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.

FERRARA, N.; FRANTZ, G.; LECOUTER, J.; DILLARD-TELM, L.; PHAM, T.; DRAKSHARAPU, A.; GIORDANO, T.; PEALE, F. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. **American Journal of Pathology**, v. 162, n. 6, p. 1881-1893, 2003.

FERRARA, N.; CHEN, H.; DAVIS-SMYTH, T.; GERBER, H. P.; NGUYEN, T. N.; PEERS, D.; CHISHOLM, V.; HILLAN, K. J.; SCHWALL, R. H. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. **Nat Med**, v. 4, n. 3, p. 336-340, 1998.

FERRAZ, J.B.S. Impacto econômico na pecuária de leite e de corte do Brasil, como aumento da utilização da inseminação artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.20, p.95-98, 1996.

FERREIRA, J. C.; GASTAL, E. L.; GINTHER, O. J. Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. **Reproduction**, v. 135, p. 541-550, 2008.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.

FILICORI, M.; FAZLEABAS, A. T.; HUHTANIEMI, I.; LICHT, P.; RAO, C. V.; TESARIK, J.; ZYGMUNT, M. Novel concepts of human chorionic gonadotropin: reproductive system interactions and potential in the management of infertility. **Fertility and Sterility**, v. 84, n. 2, p. 275-284, 2005.

FLINT, A. P. F.; SHELDRIK, E. L. Evidence for systemic role for ovarian oxytocin in luteal regression in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.67, p.215-225, 1983.

FORD, S. P.; CHRISTENSON, R. K.; CHENAULT, J. R. Pattern of blood flow to the uterus and ovaries of ewes during the period of luteal regression. **Journal of Animal Science**, v. 49, p. 1510-1516, 1979.

FORD, S. P. Control of uterine and ovarian blood flow throughout the estrous cycle and pregnancy of ewes, sows and cows. **Journal of Animal Science**, v. 55, sup. 2, p. 32–42, 1982.

FORD, S. P.; CHENAULT, J. R. Blood flow to the corpus luteum-bearing ovary and ipsilateral uterine horn of cows during the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 555–562, 1981.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; DUFFY, G. B.; DUFFY, P.; MEHTA, J. P.; O'GAORA, P.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; CROWE, M. A. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 2, p. 266-278, 2011.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648-654, 2001.

FRANÇA, I. G. **Efeito do escore do trato reprodutivo na dinâmica folicular e dopplerfluxometria útero-ovariana em novilhas nelore (Bos indicus)**. 2016. 73 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, 2016.

FRANCA, L. M., RODRIGUES, A. S., BRANDÃO, L. G. N., LOIOLA, M. V. G., CHALHOUB, M., FERRAZ, P. A., RIBEIRO FILHO, A. D. L. Comparação de dois ésteres de estradiol como indutores da ovulação sobre o diâmetro folicular e a taxa de gestação de bovinos leiteiros submetidos a programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, n. 04, p. 958-965, 2015.

FREITAS, B. G.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; MACEDO, G. G.; SANTOS MIRANDA, M.; BARUSELLI, P. S. Resposta ovariana após o uso de Benzoato de Estradiol e Cipionato de Estradiol como indutores de ovulação em protocolos de sincronização para IATF em fêmeas da raça holandesa. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (Anais), 2013, Praia do Forte, BA.

FRASER, H. M.; DICKSON, S. E.; LUNN, S. F.; WULFF, C.; MORRIS, K. D.; CARROLL, V. A.; BICKENELL, R. Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. **Endocrinology**, v. 141, p. 995-1000, 2000.

FUCK, E. J.; MORAES, G. V.; MARTINS, E. N.; FALCÃO, A. J. S.; RODRIGUES, C. M.; CARDOZO, R. M.; BARROS, C. M. Uso da gonadotrofina coriônica equina em receptoras de embriões para avaliar o incremento da progesterona endógena no dia da inovulação e sua correlação com a taxa de prenhez. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 4, p. 1119-1126, 2002.

GARRIDO, C.; SAULE, S.; GOSPODAROWICZ, D. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. **Growth Factors**, v. 8, n. 2, p. 109-117, 1993.

GATELY, S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 19, n. 1-2, p. 19-27, 2000.

GEVA, E.; JAFFE, R. B.; Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. **Fertility and Sterility**, v. 74, p. 429-438, 2000.

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M.; BARUSELLI, P. S. Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em novilhas Nelore (Bos indicus). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.210, 2005.

GIMENES, L.U.; SÁ, FILHO, M.F.; CARVALHO, N.A.T.; TORRES JUNIOR, J.R.S.; SOUZA, A.H.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; SARTORELLI, E.S.; BARROS, C.M.; CARVALHO, J.B.P.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.69, n.7, p.852-858, 2008.

GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare. *Basic and applied aspects*, 1992.p. 75.

GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging and animal reproduction: Color-Doppler ultrasonography. Cross Plains: Equiservices Publishing, 2007. p. 258.

GINTHER, O. J.; SILVA, L. A.; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF α , luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biol Reprod**, v. 76, n. 3, p. 506-513, 2007.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3, p. 239-257, 2003.

GINTHER, O. J. A 40-year odyssey into the mysteries of equine luteolysis. **Theriogenology**, v. 72, p. 591-598, 2009.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; COOPERA, D. A. Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17 β -estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 311–317, 2009.

GINTHER, O.; KASTELIC, J.; KNOFF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 20, p. 187-200, 1989.

GOBIKRUSHANTH, M.; DUTRA, P. A.; BRUINJÉ, T. C.; COLAZO, M. G.; BUTLER, S. T.; AMBROSE, D. J. Characterization of the variability and repeatability of gonadotropin-releasing hormone-induced luteinizing hormone responses in dairy cows within a synchronized ovulation protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 6753-6762, 2017.

GRAZZINI, E.; GHILLON, G.; ZINGG, H. H. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. **Nature**, v. 392, p.509–512, 1998.

GREISS, F. C.; ANDERSON, S. G. Effect of ovarian hormones on uterine vascular bed. **American Journal of Obstetric and Gynecology**, v. 107, p. 829-836, 1970.

HADLEY, M.E. Endocrinology. 4.ed. Tucson: Prentice Hall, 1996. 518p.

HANLON, D.W.; WILLIAMSON, N.B.; WICHTEL, J.J. Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v.47, p.963-75, 1997.

HAOUZI, D.; MAHMOUD, K.; FOURAR, M.; BENDHAOU, K.; DECHAUD, H.; DE VOS, J.; RE`ME, T.; DEWAILLY, D.; HAMAMAH, S. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. **Human Reproduction**, v. 2, p. 198-205, 2009.

HARTT, L. S.; CARLING, S. J.; JOHNSON, G. A.; VANDERWALL, D. K.; OTT, T. L. Temporal and Spatial associations of oestrogen receptor and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. **Reproduction**, v. 130, p. 241-250, 2005.

HERVÉ, M. A.; MEDURI, G.; PETIT, F. G.; DOMET, T. S.; LAZENNEC, G.; MOURAH, S.; PERROT-APPLANAT, M. Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus. **Journal of Endocrinology**, v. 188, n. 1, p. 91-99, 2006.

HERYANTO, B.; LIPSON, K. E.; ROGERS, P. A. Effect of angiogenesis inhibitors on oestrogen-mediated endometrial endothelial cell proliferation in the ovariectomized mouse. **Reproduction**, v. 125, n. 3, p. 337-346, 2003.

HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 51-58, 2007.

HONNENS, A.; NIEMANN, H.; PAUL, V.; MEYER, H. H. D.; BOLLWEIN, H. Doppler sonography of the uterine arteries during a superovulatory regime in cattle uterine blood flow in superovulated cattle. **Theriogenology**, v. 70, p. 859-867, 2008.

HYDER, S. M.; MURTHY, L.; STANCEL, G. M. Progesterin regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 58, p. 392-395, 1998.

HYDER, S. M. The role of steroid hormones on the regulation of vascular endothelial growth factor. **The American journal of pathology**, v. 161, p. 345, 2002.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 629-683, 2001.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Ciclos reprodutivos: Bovinos e Bubalinos. **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, Cap.11, p.159-171, 2004.

KAMAT, B. R.; BROWN, L. F.; MANSEAU, E. J.; SENGHER, D. R.; DVORAK, H. F. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. **American Journal of Pathology**, v. 146, p. 157-165, 1995.

KÖSTER, K.; POULSEN NAUTRIP, C.; GÜNZEL-APEL, A. R. A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. **Reproduction**, v. 122, p. 453-461, 2001.

KUMAR, S.; BRUDNEY, A.; CHEON, Y. P.; FAZLEABAS, A. T.; BAGCHI, I. C. Progesterone induces calcitonin expression in the baboon endometrium within the window of uterine receptivity. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1318-1323, 2003.

LAMMING, G. E.; MANN, G. E. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F2 alpha production in cows by progesterone and oestradiol. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 69-73, 1995.

LANDAETA-HERNÁNDEZ, A.J.; PALOMARES-NAVEDA, R.; SOTO-CASTILLO, G.; ATENCIO A.; CHASE-JR C.C.; CHENOWETH P.J. Social and breed effects on the expression of a PGF2α induced oestrus in beef cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, p.315-

320, 2004.

LARSON, L.L.; BALL, P.J.H. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. **Theriogenology**, v.38, p.255-267, 1992.

LECCE, G.; MEDURI, G.; ANCELIN, M.; BERGERON, C.; PERROT-APPLANAT, M. Presence of estrogen receptor beta in the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal, and vascular cells. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**. v.86, n. 3, p. 1379-1386, 2001.

LI, X.; O'MALLEY, B. W. Unfolding the action of progesterone receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 39261-39264, 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal Animal Science**, v. 70, p. 3615-3626, 1992.

MCDOWELL, K.J.; ADAMS, M.H.; ADAM, C.Y.; SIMPSON, K.S. Changes in equine endometrial oestrogen receptor α and progesterone receptor mRNAs during the o estrous cycle, early pregnancy and after treatment with exogenous steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 135-142, 1999.

MACHADO, R.; CORRÊA, R. F.; BARBOSA, R. T.; BERGAMASCHI, M. A. C. M. Escore de condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, p. 16, 2008.

MALUF, D.Z. **Avaliação da reutilização de implantes contendo progestágenos para controle farmacológicos do ciclo estral e da ovulação em vacas de corte**. 60 fls. Dissertação (mestrado), Piracicaba, São Paulo, 2002.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrus cycle in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 64, p. 171-180, 2000.

MARION, J.C. **Contabilidade da pecuária**. 6. ed. São Paulo: Atlas, p.164, 2001.

MARQUES, M. O.; SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; FIGUEIREDO, T. B; SORIA, G. F; BARUSELLI, P. S. Efeito do tratamento com PGF2 α na inserção e/ou tratamento com eCG na remoção do dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo em novilhas nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 1, p. 287-287, 2005.

MARTÍNEZ, M. F.; BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Synchronization of follicular wave emergence and ovulation for reproductive biotechnologies. **In I Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina**, p. 20-56, 2004.

MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; JANZEN, E.; OLSON, W.; MAPLETOFT, R.J. Alternative methods of synchronizing estrus and ovulation for fixed-time insemination in cattle. **Theriogenology**, v.49, p.350, 1998.

MASLAR, I. A.; POWERS-CRADDOCK, P.; ANSBACHER, R. Decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium: effects of continuous and intermittent progesterone treatment. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 741-750, 1986.

MATSUMOTO, L. C.; BOGIC, L.; BRACE, R. A.; CHEUNG, C. Y. Prolonged hypoxia upregulates vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in ovine fetal membranes and placenta. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 186, n. 2, p. 303-310, 2002.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; TURRIANI, M.; GALEATI, G.; ZANNONI, A.; CASTELLANI, G.; BERARDINELLI, P.; SCAPOLLO, P. A. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1014-1019, 2001.

MCCRACKEN, J.A., CUSTER, E.E., LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 263-323, 1999.

MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O. G.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, p. 179-189, 2009.

MESQUITA, F. S.; PUGLIESI, G.; SCOLARI, S. C.; FRANÇA, M. R.; RAMOS, R. S.; OLIVEIRA, M.; PAPA, P. C.; BRESSAN, F. F.; MEIRELLES, F. V.; SILVA, L. A.; NOGUEIRA, G. P.; MEMBRIVE, C. M.; BINELLI, M. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. **Theriogenology**, v. 81, n. 6, p. 861-869, 2014.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; HAYASHI, K. G.; KAMADA, D.; AWASHIMA, C.; KANEKO, E.; ACOSTA, T.J.; MATSUI, M.A. Potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: New observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, p. 153-160, 2006.

MOENTER, S.M.; CARATY, A.; KARSCH, J.F. The estradiol - induced surge of gonadotropin-hormone in the ewe. **Endocrinology**, v.127, p.1375-1384, 1990.

MOREIRA, F. R. L.; DE LA SOTA, T.; THATCHER, W. W. Effect of day of estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. **Journal Animal Science**. v.78, p.1568-1576, 2002.

MOTE, P. A.; ARNETT-MANSFIELD, R. L.; GAVA, N.; DEFAZIO, A.; MULACJERICEVIC, B.; CONNEELY, O. M.; CLARKE, C. L. Overlapping and distinct expression of progesterone receptors A and B in mouse uterus and mammary gland during the estrous cycle. **Endocrinology**, v. 147, p. 5503-5512, 2006.

MULAC-JERICEVIC, B.; LYDON, J. P.; DEMAYO, F. J.; CONNEELY, O. M. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 9744-9749, 2003.

MULAC-JERICEVIC, B.; MULLINAX, R.A.; DEMAYO, F.J.; LYDON, J.P.; CONNEELY, O. M. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. **Science**, v. 289, p.1751-1754, 2000.

MURDOCH, W.; PETERSON, T.; VAN KIRK, E.; VINCENT, D.; INSKEEP, E. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 35, p. 1187–1194, 1986.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotrophin. **Endocrine Reviews**, v. 12, p. 2744, 1991.

NEUFELD, G.; COHEN, T.; GENGRINOVITCH, S.; POLTORAK, Z. vascular endothelial growth factor and its receptors. **The Faseb Journal**, v. 13, p. 9-22, 2000.

NUNEZ, OLIVERA, R.; CASTRO, T.; GARCIA, PINTOS, C.; BÓ, G.; PIAGGIO, J.; MENCHACA, A. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol based treatment in postpartum anestrous beef cattler. **Animal Reproduction Science**, v. 146, p. 111-116, 2014.

OKUMU, L. A.; FORDE, N.; FAHEY, A. G.; FITZPATRICK, E.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A.; LONERGAN P. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. **Reproduction**, v. 140, p. 143–153, 2010.

OLIVEIRA, L. S. R.; DE SOUZA, A. L. B.; KOZICKI, L. E.; SEGUI, M.; PEDOSA, V. B.; JUNIO, J. A. D. A.; DE ABREU, A. C. M. R. Potencial da deslorelina como agente indutor da ovulação em vacas primíparas *Bos taurus indicus* na inseminação artificial em tempo fixo. **Veterinária e Zootecnia**, v.24, p.363-372, 2017.

PANCARCI, S. M.; JORDAN, E. R.; RISCO, C. A.; SCHOUTEN, M. J.; LOPES, F. L., MOREIRA, F.; THATCHER, W. W. Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 85, p. 122-131, 2002.

PAPA, P. C.; MOURA, C. E.; ARTONI, L. P.; FÁTIMA, L. A.; CAMPOS, D. B.; MARQUES, J. E.; BARUSELLI, P. S.; BINELLI, M.; PFARRER, C.; LEISER, R. VEGF system expression in different stages of estrous cycle in the corpus luteum of non-treated and superovulated water buffalo. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 33, n. 4, p. 379-389, 2007.

PEGORER, M. F.; ERENO, R. L.; SATRAPA, R. A.; PINHEIRO, V. G.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Neither plasma progesterone concentrations nor exogenous eCG affects rates of ovulation or pregnancy in fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols for puberal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 75, p. 17-23, 2011.

PENTEADO, L.; AYRES, H.; MADUREIRA, E. H.; REIS, E.L.; BARUSELLI, P. S. Efeito do eCG e do desmame temporário na taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32. p. 223, 2004.

PENTEADO, L.; AYRES, H.; TORRES - JÚNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; BARUZELLI, P. S.; Taxa de concepção de vacas Nelore lactantes sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona associado ao benzoato ou cipionato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae** , v. 34, p.401, 2006.

PENTEADO, L.; MARQUES, M. O.; SILVA, R. C. P.; AYRES, H.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P.S. Taxa de prenhez em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo em diferentes períodos pós-parto. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 402, 2006.

PEREIRA, C.H.; GOTTSCHALL, C.S.; MATTOS, R.C.; EVANGELISTA, G.T.; SILVA, B.V.C.; JOBIM, M.I.M; GREGORY, R.M. Luteólise antecipada em protocolo de inseminação artificial em tempo fixo com progesterona em vacas no pós-parto. **Veterinária Notícias**, v.17, p. 42-49, 2011.

PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. 2. ed. Belo Horizonte, MG: FEP/MVZ, 480p, 1999.

PERROT-APPLANAT, M.; DENG, M.; FERNANDEZ, H.; LELAIDIER, C.; MEDURI, G.; BOUCHARD, P. Immunohistochemical localization of estradiol and progesterone receptors in human uterus throughout pregnancy: expression in endometrial blood vessels. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 78, p. 216-224, 1994.

PFEIFER, L. F. M.; LEONARDI, C. E. P.; CASTRO, N. A.; VIANA, J. H. M., SIQUEIRA, L. G. B.; CASTILHO, E. M.; SINGH, J.; KRUSSER, R. H.; RUBIN, M. I. B. The use of PGF2 α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v.81, p. 689-695, 2014.

PFEIFER, L. *et al.* Prostaglandin F2 α or estradiol benzoate to induce ovulation in timed artificially inseminated dairy cows. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 738-744, 2016.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v.29, p.21-37, 1988.

PRICE, C. A.; CARRIERE, P. D.; GOSSELIN, N.; KOHRAM, H.; GUILBAULT, L. A. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 37-46, 1999.

RAINE-FENNING, N. J.; CAMPBELL, B. K.; KENDALL N. R.; CLEWES J. S.; JOHNSON I. R. Endometrial and subendometrial perfusion are impaired in women with unexplained subfertility. **Human Reproduction**, v. 19, p. 2605-2614, 2004.

RAYMUNDO, C.; SILVEIRA, R. S.; OLIVEIRA, A. P.; PASCHOAL, J. J. Utilização de gonadotrofina coriônica equina e cipionato de estradiol em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo para vacas Gir lactantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA (Anais eletrônicos), 2017, Campinas, GALOÁ, 2018.

RAWY M.; MIDO S.; ALI HE.; DERAR D.; MEGAHED G.; KITAHARA G.; OSAWA T. Effect of exogenous estradiol Benzoate on uterine blood flow in postpartum dairy cows. **Anim Reprod Sci.** 192, 136-145, 2018.

RHODES, F. M.; FITZPATRICK, L. A.; ENTWISTLE, K. W.; & DE'ATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in Bos indicus heifers before and after nutritional anoestrus. **Reproduction**, v.104, p. 41-49, 1995.

ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; LAMMING, G.E.; WATHES, D.C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.122, p.965-979, 2001.

ROBINSON, R. S.; NICKLIN, L. T.; HAMMOND, A. J.; SCHAMS, D.; HUNTER, M. G.; MANN, G. E. Fibroblast growth factor 2 is more dynamic than vascular endothelial growth factor A during the follicle-luteal transition in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 28-36, 2007.

RODRIGUES, C. A.; MANCHILLA, R. F.; FERREIRA, R. M.; SANTANA, R. V.; SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; MADUREIRA, E. H.; SANTOS, E.; BARUSELLI, P. S. Efeito do uso do implante auricular de Norgestomet associado ao cipionato de estradiol na sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo. In: CONGRESSO MUNDIAL DE BUIATRIA, 2006.

ROMAN-PONCE, H.; THATCHER, W. W.; CATON, D.; BARRON, D. H.; WILCOX, C. J. Thermal-stress effects on uterine blood-flow in dairy-cows. **Journal of Animal Science**, v. 46, p. 175–180, 1978.

ROMAN-PONCE, H.; CATON, D.; THATCHER, W. W.; LEHRER, R. Uterine blood flow in relation to endogenous hormones during estrous cycle and early pregnancy. **American Journal of Physiology**, v. 245, p. 843-849, 1983.

SÁ FILHO, M. F.; TORRES - JÚNIOR, J. R. S.; PENTEADO, L.; GIMENES, L. U.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 2-4, 2010.

SÁ FILHO, M. F.; SANTOS, J. E. P.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Importance of estrus on pregnancy submitted to estradiol/progesterone- based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, p.455-463, 2011.

SAGSÖZ, B. G.; SARUHAN, H. The expression of vascular endothelial growth factor and its receptors (flt1/fms, flk1/KDR, flt4) and vascular endothelial growth inhibitor in the bovine uterus during the sexual cycle and their correlation with serum sex steroids H. **Theriogenology**, v. 75, p. 1720–1734, 2011.

SALES, J.N.S.; CARVALHO, J.B.P.; CREPALDI, G.A.; MAIO, J.R.G.; CARVALHO, C.A.B.; BARUSELLI, P.S. Rate and timing of ovulation in Nelore cows treated with estradiol cypionate or benzoate to induce ovulation on FTAI protocols. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.181, 2008.

SALES, J. N. D. S.; CREPALDI, G. A.; GIROTTO, R. W.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Animal reproduction science**, v. 124, p. 12-18, 2011.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; CIPRIANO, R. S.; JACOMINI, J. O.; MAIO, J. R. G.; BARUSELLI, P. S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v.78(3),p. 510-516, 2012.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382-2394, 2005.

SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1403-1409, 2001.

SÁVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P. et al. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, p.663-671, 1988.

SHIMIZU, T.; JIANG, J. Y.; SASADA, H.; SATO, E. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1846-52, 2002.

SHIMIZU, T.; KREBS, S.; BAUERSACHS, S.; BLUM, H.; WOLF, E.; MIYAMOTO, A. Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium. **Physiological Genomics**, v. 42A, p. 290-300, 2010.

SILVA, L. A.; GINTHER, O. J. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. **Reproduction**, v. 139, p. 453-463, 2010.

SILVA, P. R. B.; DE SOUZA, M. A.; DOS SANTOS, S. F.; DOS SANTOS, R. M. Regulação farmacológica do ciclo estral de bovinos. **PUBVET**, Londrina, v.5, n. 39, ed. 186, art. 1254, 2011.

SILVA, R. C. P.; RODRIGUES, C. A.; MARQUES, M. O.; AYRES, H.; REIS, E. L.; NICH, M.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S. Efeito do eCG e do GnRH na taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32. p. 221, 2004.

SILVA, L.A.; GASTAL, E.L.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biol Reprod**, v. 72, p. 755–61, 2005.

SMITH, S. K. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. **Human Reproduction Update**, v. 4, p. 509-519, 1998.

SMITH, S. K. Regulation of angiogenesis in the endometrium. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 12, p. 147-151, 2001.

SOUZA, A.H.; CUNHA, A.P.; CARAVIELLO, D.Z.; WILTBANK, M.C. Profiles of circulating estradiol-17 β after different estrogen treatments in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.2, p.224-232, 2005.

SONE, H.; OKUDA, Y.; KAWAKAMI, Y.; HANATANI, M.; SUZUKI, H.; KOZAWA, T.; HONMURA, S.; YAMASHITA, K. Vascular endothelial growth factor level in aqueous humor of diabetic patients with rubeotic glaucoma is markedly elevated. **Diabetes Care**, v. 19, p. 1306-1307, 1996.

SPRAGUE, B. J.; PHERNETTON, T. M.; MAGNESS, R. R.; CHESLER, N. C. The effects of the ovarian cycle and pregnancy on uterine vascular impedance and uterine artery mechanics. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 144, p.170–178, 2009.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **System for Microsoft Windows**: release 8.2. Cary: 2001.

STEWART, F.; ALLEN, W.R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 527-36, 1981.

TANIKAWA, M.; ACOSTA, T. J.; FUKUI, T.; MURAKAMI, S.; KORZEKWA, A.; SKARZYNSKI, D. J.; OKUDA, K. Regulation of prostaglandin synthesis by interleukin-1 α in bovine endometrium during the estrous cycle. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 78, p. 279-290, 2005.

TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; PIRES, M.F.A.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H.; M.,CAMARGO, L. S. A.; RAMOS, A. A.; FOLHADELLA, I. M.; POLISSENI, J.; FREITAS, C.; CLEMENTE, C.A.A.; SÁ FILHO, M. F.; PAULA-LOPES, F.F.; BARUSELLI, P. S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, 69, 155-166, 2008.

TORRES - JÚNIOR, J. R. S.; PENTEADO, L.; SALES, J. N. S.; SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; BARUSELLI, P. S. A comparison of two different esters of estradiol for the induction of ovulation in an estradiol plus progestin-based timed artificial insemination protocol for suckled *Bos indicus* beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 151, p. 9-14, 2014.

TSAI, M. J.; O'MALLEY, B. W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 451-486, 1994.

USLENGHI, G.; VATER, A.; RODRÍGUEZ AGUILAR, S.; CABODEVILA, J.; CALLEJAS, S. Effect of estradiol cypionate and Gn RH treatment on plasma estradiol-17 β concentrations, synchronization of ovulation and on pregnancy rates in suckled beef cows treated with FTAI-based protocols. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, p. 693-699, 2016.

VAN VLIET, J.H.; VAN EERDENBURG, F.J.C.M.; Sexual activities and oestrus detection in lactating Holstein cows. **Applied Animal Behaviour Science**, v.50, p.57-69, 1996.

VIANA, J. H. M.; ARASHIRO, E. K. N.; SIQUEIRA, L. G. B.; GHETTI, A. M.; AREAS, V. S.; GUIMARÃES, C. R. B.; FERNANDES, C. A. C. Doppler ultrasonography as a tool for ovarian management. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 215-222, 2013.

VONNAHME, K. A.; WILSON, M. E.; LI, Y.; RUPNOW, H. L.; PHERNETTON, T. M.; FORD, S. P.; MAGNESS, R. R. Circulating levels of nitric oxide and vascular endothelial growth factor throughout ovine pregnancy. **Journal of Physiology**, v. 565, n. 1, p. 101-109, 2005.

VYNCKIER, L.; DEBACKERE, M.; DE KRUIF, A.; CORYN, M. Plasma estradiol-17 β concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 β benzoate and estradiol-17 β cypionate-a preliminary study. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 13, p. 36-42,1990.

WAITE, A.L.; HOLTEN, D.W.; STORMSHAK, F. Changes in bovine luteal progesterone metabolism in response to exogenous prostaglandin F2 α . **Domestic Animal Endocrinology**, v.28, p.162-171. 2005.

WATSON, E.D.; SKOLNIK, S.B.; ZANECOSKY, H.Z. Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. **Theriogenology**, v.38, p. 575- 580, 1992.

WATSON, E.D.; HEALD, M.; TSIGOS, A.; LEASK, R.; STEELE, M.; GROOME, N.P.; RILEY, S.C. Plasma FSH, inhibin A, and inhibin isoforms containing pro- and dC during winter anestrus, spring transition, and the breeding season in mares. **Reproduction**, v.123, p.535–542, 2002.

WEN, L.; CHEN, L. H.; LI, H. Y.; CHANG, S. P.; LIAO, C. Y.; TSUI, K. H.; SUNG, Y. J.; CHAO, K. C. Roles of estrogen and progesterone in endometrial hemodynamics and vascular endothelial growth factor production. **Journal of Chinese Medicine Association**, v. 72, p. 188–193, 2009.

WHITE, F.J.; WETTEMANN, R.P.; LOOPER, M.L.; PRADO, T.M.; MORGAN, G.L. Seasonal effects on estrous behavior and time of ovulation in non-lactating beef cows. **Journal Animal Science**, v.80, p.3053-3059, 2002.

WILTBANK, J.N.; STURGES, J.C.; WIDEMAN, D.; LEFEVER, D.G.; FAULKNER, L.D. Control of estrus and ovulation using subcutaneous implants and estrogens in beef cattle. **Journal Animal Science**, v.33, p.600-606, 1971.

WILTBANK, M. C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid cycle corpus luteum function. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1873-1883, 1994.

WILTBANK, M. C.; PURSLEY J. R. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 170-185, 2014.

WULFF, C.; WILSON, H.; LARGUE, P.; DUNCAN, W. C.; ARMSTRONG, D. G.; FRASER, H. M. Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, p. 4302-4309, 2000.

ZINGG, H. H.; ROZEN, F.; BRETON, C.; LARCHER, A.; NECULCEA, J.; CHU, K.; RUSSO, C.; ARSLAN, A. Gonadal steroid regulation of oxytocin and oxytocin receptor gene expression. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, n. 395, p. 395–404, 1995.

ANEXOS

- Artigo científico aceito na revista Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences

Gene expression and Doppler flowmetry of the reproductive tract in Nelore cows (*Bos indicus*) synchronized with estradiol and eCG

Itamara Gomes de França ¹ (<https://orcid.org/0000-0001-6026-8883>),

Nancyleni Pinto Chaves Bezerra ² (<https://orcid.org/0000-0003-3970-7524>),

Alcina Vieira de Carvalho Neta ^{1,3} (<https://orcid.org/0000-0001-7132-5265>),

Larissa Sarmento dos Santos ² (<https://orcid.org/0000-0001-8237-1988>),

Diego Luís dos Santos Ribeiro ¹ (<https://orcid.org/0000-0003-3863-4933>),

José Ribamar de Souza Torres Júnior ^{1,4*} (<https://orcid.org/0000-0002-6356-6517>)

¹ Biodiversity and Biotechnology Network of the Legal Amazon (BIONORTE), Federal

University of Maranhão - São Luís City / MA, Brazil.

² Professional Graduate Program in Animal Health Defense, Maranhão State University, São Luís City / MA, Brazil.

³ Chemistry and Biology Department, Maranhão State University, São Luís City / MA, Brazil

⁴ Oceanography and Limnology Department, Federal University of Maranhão, São Luís City / MA, Brazil.

*Corresponding author - E-mail: jose.torres@ufma.br Fax/phone number: 00 55 98 3272-8561

- Address: Avenida dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, São Luís, Maranhão, Brazil, CEP. 65080-805

Abstract

Forty Nelore cows were randomly distributed in 2x2 factorial arrangement, subjected to estradiol cypionate or benzoate (EC0h vs EB24h) application (as ovulation inducers), as well as to eCG vs No-eCG treatment based on timed artificial insemination (TAI) protocols in order to assess the effect of estradiol esters and eCG on VEGF, OXTR and PGR gene expression, E2/P4 concentrations and Doppler-flowmetry of the reproductive tract of the investigated models. Ovulation rate was higher in animals subjected to the EC+eCG treatment ($P<0.05$). Follicular vascularization was not influenced by the ovulation inducer ($P>0.05$), although it was influenced by the eCG treatment ($P<0.05$). EB enabled higher vascularized area rate in CL ($P=0.0192$). VEGF and PGR genes were more expressed in animals treated with EB and eCG. On the other hand, OXTR expression was lesser evident in eCG-treated cows, which may have induced higher P4 concentrations in follicular fluid at proestrus/estrus (D10) and in blood serum in the subsequent diestrus (D18) ($P<0.05$). Ovulation inducer did not show any effect on P4 and E2 plasma concentrations ($P>0.05$) in the diestrus subsequent to protocol application. Nevertheless, EC has led to higher E2:P4 ratio in follicular fluid. This outcome indicated higher follicular estrogenic activity at D10, which justified the higher ovulation rate, when EC was associated with eCG ($P<0.05$). Finally, the results of the present study corroborate the hypothesis that the different estradiol esters and eCG administration differentially regulate vascularization, steroidogenesis and utero-ovarian gene expression in *Bos indicus* cows submitted to TAI protocols.

Keywords: timed artificial insemination, estradiol ester, gonadotrophin, genes, ultrasound

1. Introduction

Reproductive efficiency is the trait that mostly influences commercial cattle herds' productivity and profitability. The programmed use of reproductive hormones, and of their analogues, in

timed artificial insemination (TAI) protocols is the main strategy adopted to increase the service rate of cows in reproduction processes. This procedure allows synchronizing both the ovulation and insemination of all females available for reproduction. However, mean fertilization rates at the first artificial insemination procedure have historically reached 50% (BARUSELLI et al., 2012; WILTBANK and PURSLEY, 2014), and it indicates that a significant number of inseminated females failed to get pregnant.

Different strategies have been suggested to help improving the effectiveness of synchronization techniques applied to TAI. Among them, one finds the use of equine chorionic gonadotropin (eCG) to stimulate preovulatory follicle growth, increase progesterone (P4) corpus luteum (CL) production and improve pregnancy rates (Bó et al., 2002; Sá filho et al., 2010; Sales et al., 2011). In addition, estradiol benzoate (EB) is administered at early protocol application stage in order to induce atresia in developing follicles, and it leads to the emergence of new follicular wave (Driancourt, 2001). More recently, estradiol cypionate (EC) has been widely used at intravaginal device removal time in order to induce LH peak between 45 and 49 hours, as well as ovulation between 67 and 70 hours after treatment (Sales et al., 2012).

The use of these exogenous hormones in TAI protocols leads to differential gene expression in bovine endometrium (Shimizu et al., 2010). Genomic effects of steroid hormones, estradiol (E2) and P4 on the endometrium are mainly mediated by their connection to their receptors (Robinson et al., 2001; Okumu et al., 2010). Among the genes of importance in this context, one finds VEGF (vascular endothelial growth factor), OXTR (oxytocin receptor) and PGR (progesterone receptor), which are associated with angiogenesis, follicular and uterine development (Artac et al., 2009; Smith, 2001), as well as with uterine receptivity for embryonic implantation (Haouzi et al., 2009; Bratta et al., 1996; Bridges et al., 2005).

Changes in P4 serum concentrations at early luteal stage can lead to temporal variations in the composition and number of transcripts in bovine endometrium (Forde et al., 2011; Mesquita et

al., 2014). E2 increases the expression of its own receptors, as well as of PGR and OXTR in the endometrium (Boos et al., 1996; Robinson et al., 2001; Lamming and Mann, 1995).

In addition, exogenous hormones are capable of modulating the blood vascular pattern in animals' reproductive tract (Bollwein et al., 2000; Ford and Chenault, 1981). The uterus of female cattle, as well as of other species, undergoes physiological changes throughout the estrous cycle and each cycle stage is directly linked to uterine vascular perfusion (Bollwein et al., 1998; 2002). These changes are regulated by steroidal hormones and by a network of complex interactions between local growth factors secreted by the uterine epithelium and stroma (Roman-Ponce et al. ; 1983; Bollwein et al., 2002; Sagsoz and Saruhan, 2011).

E2 is a steroidal hormone known for its vasodilatory effect (Ford, 1982; Ginther, 1992), whereas P4 increases uterine receptivity to the embryo through the induction of endometrial angiogenesis (Wen et al., 2009). Some studies have emphasized the influence of eCG administration on CL formation and vascularization, as well as on P4 production and increased uterine blood flow, both in embryo recipients and donors (Fuck et al., 2002; Baruselli et al., 2004; Honnens et al., 2008). Thus, gene expression and blood vascular pattern in the reproductive tract can be regulated by exogenous hormones used in TAI protocols. Therefore, the aim of the current study was to analyze the influence of hormonal protocols on hemodynamics and gene expression, which are directly linked to follicles' ovulatory capacity, CL development, gonadal steroidogenesis and associated endometrial responses.

1. Materials and Methods

2.1 Study site and animals

The current study was carried out in a commercial farm in Barra do Corda County, Maranhão State, Brazil (latitude 5°30'21" South and longitude 45°14'34" West). Animal models were kept in extensive breeding system comprising Mombasa grass pasture (*Megathyrus maximus*), mineral supplementation and water *ad libitum*. The experiment comprised 40 multiparous

lactating Nelore (*Bos indicus*) cows, at mean age 48.0 ± 0.0 months, in anestrus, with postpartum period ranging from 35 to 60 days, and body condition score (BCS) of 3.0 ± 0.0 , based on Machado et al. (2008).

Experimental procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Research of Federal University of Maranhão (CEUA-UFMA), under Protocol N. 23115.014522/2020-37.

2.2 Experimental design

The experiment followed a complete randomized block design (RCBD), at 2x2 factorial arrangement, with 4 treatments and 10 repetitions (each). Follicular diameter at P4 device removal day (D8; protocol application day 8) was used as blocking factor.

2.3 Hormonal protocol

All female individuals received a new intravaginal device filled with 1 g of P4 (Sincrogest®, Ourofino, São Paulo, Brazil) and 2 mg of Estradiol Benzoate (EB; Estrogen®, Farmavet, São Paulo, Brazil) at protocol application day 0 (D0). Intravaginal devices were removed and 0.150 mg of D-cloprostenol (PGF; Prolise®, Arsa, Buenos Aires, Argentina) was administered to all animals at day 8 (D8). From this day on, female individuals were blocked, based on the dominant follicle diameter, in two groups that received 400UI of eCG, or not (SincroeCG®, Ourofino, São Paulo, Brazil). Next, cows were blocked again in order to receive 1 mg of EC (ECP®, Zoetis Saúde animal, São Paulo, Brazil) at intravaginal device removal time (D8) or 1 mg of BE, 24 hours after it (D9) (Figure 1); animals composed the following groups: EC, EC+eCG, EB or EB+eCG.

2.4 Ultrasound evaluations

Animals were subjected to 5 ultrasound evaluations at protocol application days 0, 8, 9, 10 and 18 (Figure 1); these evaluations were performed with the aid of ultrasound device (Mindray®,

Model Z5Vet, Digital Ultrasonic Diagnostic Imaging System) equipped with 7.5 MHz transrectal linear multifrequency transducer.

Examination was initially performed in bidimensional mode (B-mode; gray scale) in order to identify the uterine-ovarian structures and measure the diameters of the dominant follicle (DF) and the *corpus luteum* (CL). Next, Color-Doppler mode was activated to determine the blood perfusion area in the structures; images were recorded for further analysis.

One-minute-long real-time continuous cross-section scanning of uterine horns and ovaries was recorded in order to show the largest blood perfusion area possible with better quality image (adapted from Ferreira et al., 2008). Selected images were subjected to subjective visual evaluations by six experienced and non-experienced appraisers in order to predict the blood vascularization area (in color) proportional to the total area of each evaluated structure (0% to 100%). Objective evaluations were performed based on the intensity of the colored images (in number of pixels), as previously described for mares and heifers (Silva et al., 2005; Ginther, 2007; Ginther, 2009). The number of colored pixels in the analyzed images was counted in image editing software (Adobe Photoshop CS5) in order to measure the extension of the uterine horn, ovary, follicular wall and corpus luteum vascularization at pixel scale (Silva and Ginther, 2010).

2.5 Follicular fluid recovery *in vivo*

Dominant follicle aspiration was carried out at the end of the synchronization protocol (D10) - which corresponded to TAI time – to enable follicular fluid recovery *in vivo*, which was guided by ultrasound equipped with guiding device for the Ovum Pickup 10-gauge needle. Follicular content was recovered through aspiration, based on the application of manual negative pressure, via Teflon circuit (Wtavet®, Brazil) - 2 mm in internal diameter and 80 cm in length - connecting the needle directly to a 10-mL syringe.

2.6 Uterine biopsy

Uterine endometrium sample was collected at follicular aspiration time (D10). It was removed from the region of the middle curvature of the uterine horn ipsilateral to the ovulatory follicle, with the aid of Yomann forceps, through transcervical access. Next, collected fragments were stored in RNALater® (Ambion, Austin, USA) at -20°C, until mRNA extraction, reverse transcription and real-time PCR time at the laboratory.

2.7 Reverse Transcription mRNA extraction

Total mRNA was extracted by using the Rneasy Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), according to manufacturer's specifications, and treated with Dnase. Total RNA in 1 µL of sample was quantified through spectrophotometry with the aid of ND-100 spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, USA). The mRNA was retrotranscribed into cDNA by using the Super Script III First-Strand Synthesis System commercial kit for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), for the final volume reaction of 20 µL. In addition, 3.0 µL of DEPC water, 1.0 µL of Random Hexamer (50 µg / µL), 1.0 µL of Anneling Buffer, 2.0 µL of RNase OUT™ Enzyme Mix, 10.0 µL of 2x First were used for cDNA synthesis -Strand Reaction Mix. The following parameters were used for cDNA synthesis: 65°C for 5 minutes, incubation in ice for 1 minute, 25°C for 10 minutes and 50°C for 50 minutes. Subsequently, cDNA was subjected to conventional PCR to assess whether the amount of RNA was enough, or not. Samples were subjected to electrophoresis in 2% agarose gel, right after PCR, in order to confirm fragment size.

2.8 Real-time PCR (RT-PCR)

RT-PCR was performed based on 2.5 µL of cDNA, 10 µM of primer pair specific to each gene and 12.5 µL of Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix - with ROX, Invitrogen) at final volume of 2 µL per reaction. The following parameters were used for RT-PCR: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C

for 1 minute; RT-PCR was conducted in ABI 7500 thermocycler (Applied Biosystems). Data were analyzed based on the comparative Ct method (LIVAK and SCHMITTGEN, 2001). Ct values were normalized based on GAPDH expression. The sequence of used primers is described in Text Box 1.

2.9. E2 and P4 concentrations in follicular fluid and blood plasma.

Blood samples were collected after each ultrasound evaluation in order to determine serum concentrations of ovarian steroid hormones such as P4 and E2. In order to do so, animals' caudal vein was punctured and blood was directly collected in 10 mL Vacutainer® vacuum tubes, without anticoagulant (Becton-Dickinson & Company, USA), at room temperature. Each sample was centrifuged (3,000g for 10 minutes; Excelsa Baby® Centrifuge, Fanem, Brazil) right after collection; the serum was separated from the sample, identified and stored in sterile tubes at -20 ° C. Samples were diluted in PBS to adapt to the standard curve of the quantification kit to enable determining the steroid hormone (P4 and E2) concentrations in follicular fluid. The aforementioned dilution was performed due to high E2 (dilution ratio 1:100) and P4 (dilution ratio 1 : 50) concentrations in follicular fluid.

Analyses were based on the immunoenzymatic assay technique (ELISA); they used commercial kits to determine progesterone and estradiol in solid phase (Progesterone ELISA and 17beta-Estradiol ELISA kit, IBL International).

2.10 Statistical analysis

Data analysis was performed in the Statistical Analysis System for Windows SAS® software (version 9.4. SAS Inst. Inc., Cary, NY, USA). Normality of residues for each variable was analyzed through Shapiro-Wilk test (SAS PROC UNIVARIATE application). Whenever necessary, data were transformed (logarithm in base 10 - Log₁₀ X) to meet the assumptions of the analysis of variance. Continuous dependent variables (follicular diameter and pixels) were

subjected to ANOVA and expressed as mean and standard error of the mean (mean $\pm$ SEM), whereas means between treatments were compared through Duncan test (PROC GLM from SAS). Ovulation rate was featured at D18, based on the identification of corpus luteum formed after the luteinization of the dominant follicle aspirated at D10 (Torres-Júnior et al., 2008), and analyzed through Fisher's exact test (GraphPad Instat®; Sampaio, 2002). Hormonal concentrations, follicular vascularization area and cDNA expression for PGR, VEGF and OXTR genes have shown non-normal distribution; the model was adjusted for Poisson distribution and they were analyzed through Poisson regression (PROC GLIMMIX from SAS), based on Wang et al. (2014) and Svensson et al. (2019).

The association between variables was investigated based on the Principal Component Analysis (PCA) method in Statistica 7.1 software (Statsoft, 2007). According to the aforementioned method, the two produced axes graphically represent the strongest data pattern, i.e., it explains the important role played by the two main components in total data variation - 5% significance level was adopted to reject H0 (null hypothesis), i.e., significance level lower than 0.05 corresponded to the effect of the classificatory variables and their interactions.

3. Results

Dominant follicle and corpus luteum diameter did not differ between treatments ($P > 0.05$). Ovulation rate was significantly higher in animals subjected to the EC+eCG treatment than in those subjected to EC ($P < 0.05$). Groups treated with EB did not show the effect of eCG on ovulation rate, whereas groups treated with EC and E +eCG have shown intermediate ovulation rate ($P > 0.05$). Overall, there was no interaction between inducers and eCG (Inducer $\times$ eCG) in DF and CL diameters or in ovulation rate (Table 1).

There was no significant difference in uterine vascularization area at D8 ($P > 0.05$). However, there was effect of both EC and eCG administration, which significantly increased uterine vascularization, from D8 to D9 ($P = 0.0006$) (Table 2).

The ovulation inducer did not have effect on DF wall vascularization; however, it presented significant interaction with eCG ($P < 0.05$). This finding has shown that the best vascular response of the inducer in the current study depended on its association with eCG and on its administration time (D8 for EC and D9 for EB) (Table 2).

Female animals treated with EB recorded higher vascularized area rate both in CL ($P = 0.0192$) and in the uterus ($P = 0.0315$), in the diestrus subsequent to protocol application (D18). On the other hand, there was no effect or interaction of EB with eCG ($P > 0.05$) (Table 2).

Based on the analysis of the main effects of treatments on hormonal levels, animals treated with EC recorded higher E2: P4 ratio (Figure 2) in the follicular fluid collected at protocol application D10 (dominant pre-ovulatory follicle). Surprisingly, this association was lower in groups treated with eCG. On the other hand, eCG had positive effect on P4 concentration increase in the subsequent diestrus (D18), mainly when it was associated with EC. Serum estradiol concentrations at D18 were similar to each other, regardless of the adopted treatment ($P > 0.05$) (Figures 2 and 3).

Overall, EB has induced greater endometrial expression of the investigated genes ($P < 0.0001$; Figure 4). Ovulation inducer and eCG had isolated effect on VEGF-system gene expression, which was significantly higher in animals treated with EB ($P < 0.0001$) and eCG ($P < 0.0140$) (Figures 4 and 5). There was also high OXTR gene expression in the group treated with EB ($P < 0.0001$), although its expression was lesser evident in animals treated with eCG. The CE+eCG group has shown the lowest OXTR expression among treatments (Figures 4 and 5). PGR gene expression was also significantly higher in groups treated with BE ($P < 0.0001$) and the use of eCG had positive influence on the expression of this gene, regardless of the inducer ($P < 0.0001$). This finding has shown that increased PGR expression depends on the use of eCG in association with inducers ($P = 0.0002$) (Figures 4 and 5).

The association between variables analyzed through Mode-B ultrasonography, uterine-ovarian Color-Doppler, ovarian steroids serum concentration and uterine gene expression was

investigated through Principal Component Analysis (PCA) (Figure 6). Results have shown that the two main components, altogether, explained 40.21% of total data variation. Ovulation rate (OVU), OXTR and PGR were the most representative variables in Component 1, since they presented longer-length vectors that were closer to the Component 1 axis. DF vascularization (DFV) and follicular E2 concentration (E2) were the variables that mostly contributed to Component 2; they were highly related to each other, but they were not related to OXTR and PGR. VEGF expression and uterus vascularization (UTV) have shown strong association with each other, since they formed acute angles between their respective vectors, as shown in Figure 6.

3. Discussion

Although the current study did not find difference in follicular diameter between experimental groups, the use of inducers in association with eCG has influenced the higher ovulation rate observed for the CE+eCG group (100%). This outcome was already expected, since many other studies have shown that eCG leads to increased fertilization rate because it makes the LH preovulatory peak more consistent, as well as increases dominant follicles' responsiveness to ovulation inducers and increases ovulation rate, mainly in anestrus animals (Baruselli et al., 2006; Sales et al., 2010; Sá Filho et al., 2011; Nunez-Olivera et al., 2014; Baruselli et al., 2004a; Baruselli et al., 2004b; Baruselli et al., 2003; Marques et al., 2005; Silva et al., 2004; Rodrigues et al., 2004; Penteado et al., 2004; Baruselli et al., 2004a). In addition, according to Sá Filho et al. (2017), EC accounts for increasing the incidence of estrus and for better pregnancy rates after AI than EB.

These results have shown that, despite the divergence of information about the synchronization capacity of ovulations induced by EC administration at P4 device removal time, the use of this ovulation inducer resulted in fertilization rates similar to, or better than, those recorded for BE, in insemination procedures performed 48h (Sales et al., 2008; Silva et al., 2018), between 52 and 56h (Ayres et al., 2006) and between 54 and 58h (Penteado et al., 2006) after P4 removal. This

outcome was mainly observed when EC was used in association with eCG, which has enhanced synchronization and luteinization, besides stimulating follicular development (Pereira, 2011).

Thus, EC administration at the P4 device removal day (three management protocol; Torres-Júnior et al., 2014) has been widely used to replace BE as ovulation inducer, without compromising indices recorded for progesterone plus eCG-based protocols. Thus, EC is an alternative used to simplify synchronization programs, since it enables reducing the number of times animals should be managed without affecting synchronization treatment effectiveness, mainly in large herds (Penteado et al., 2006; Ayres et al., 2006; Castro-Júnior et al., 2008; Crepaldi, 2009).

Endometrial blood vascularization is an important factor in uterine receptivity to the fetus (Bazer et al., 2012). The vascularized uterine area rate (%) observed in the current study has changed between treatments, from 24 hours after P4 device removal onwards (D9). It may have happened due to decreased P4 concentration after P4-device withdrawal and to animals' sequential exposure to E2, which have led to vasodilation and, consequently, to increased uterine vascular flow (Fazleabas and Strakova, 2002). Another recent study has shown that dairy cows subjected to 10 mg of intramuscular EB application during the postpartum period, as well as to color Doppler ultrasound assessment, have shown increased blood flow volume and speed, as well as uterine artery diameter (Rawy et al., 2018).

The action of eCG in increasing uterine blood flow was also notable in the current study, mainly when it was associated with EB. The use of gonadotropins such as FSH, hCG or eCG in TAI protocols has increased follicular estradiol concentrations (Price et al., 1999); estradiol worked as important vasodilator in the uterine artery (Ford, 1982; Greiss and Anderson, 1970). In addition, other studies have positively correlated increased uterine blood flow to estrogen levels during estrus in cows (Bollwein et al., 2000; Ford and Chenault, 1981; Roman-Ponce et al., 1978). Honnens et al. (2008) observed increased blood flow volume and decreased uterine artery pulsatility index in a study conducted with cows subjected to superovulation treatment with gonadotropins.

Animals treated with one of the estradiol esters, either with benzoate or cypionate, did not show changes in the blood vascular pattern of DF, when they were not subjected to concomitant eCG application. However, each ovulation inducer, used in association with eCG, has induced vascular flow increase in DF, at its respective administration day (EC at D8 and EB at D9). The group treated with EB presented permanent vascularization increase from D9 to D10; this outcome was likely influenced by increased intra-follicular E2 concentrations in this group in comparison to the one treated with EC. It may have happened in response to the increased pharmacological bioavailability of EB. Vynckier et al. (1990) have observed fast increase in E2 level in the blood plasma of Holstein cows treated with 10 mg of EB; the maximum E2 level was recorded between 1 and 23 hours after EB application. On the other hand, these very same authors have observed later peak plasma E2 concentrations, after EC administration. Similar outcome was reported by Sales et al. (2012), who observed LH peak approximately 30 hours after EC administration and area under the curve twice as persistent in comparison to that of EB (8.6 ± 0.2 vs 16.5 ± 1.0 ; $P < 0.05$) (Sales et al., 2012).

Blood vascularization at follicle margin throughout proestrus and estrus is quite discreet; it presents noticeably increased blood flow approximately 6 hours before the beginning of the LH peak (Mattioli et al., 2001). Interestingly, Ginther (2007) has shown that color Doppler does not detect blood flow signs in follicles that do not ovulate, even if they have preovulatory diameter. This outcome indicates the potential of the Color-Doppler tool to assess blood flow in dominant follicles in IAT protocols, as long as vascular effects inherent to the administration time, dose and estradiol ester used to induce ovulation are also taken into consideration at test interpretation time (Bollwein et al., 2000). Ovulatory-follicle wall collapses during ovulation. In addition, angiogenic and mitogenic factors such as insulin-like growth factor, fibroblast growth factor and endothelial vascular growth factor (VEGF) under LH influence lead to corpus luteum growth and vascularization (McCracken et al., 1999). Groups treated with EB have formed more vascularized CLs in the diestrus subsequent to protocol application (D18). It may have happened due to higher

VEGF gene expression in this group.

Positive correlation between CL vascularization and P4 production was previously described by Arruda (2001) and Ginther et al. (2008). However, the use of eCG in the current study has increased P4 concentrations, but it did not influence CL vascularization. On the other hand, the EB-treated group presented larger number of vascularized CLs, but it did not present increased P4 concentrations. In addition, it is important emphasizing that, despite the different CL vascularization patterns observed among estradiol esters, its diameter remained unchanged.

According to Bollwein et al. (2002), there was no association between CL diameter and changes in blood flow. This outcome has suggested that CL neovascularization process was not associated with its dimension. Blood flow has increased in parallel with increased circulating progesterone concentration at the early CL development stage; thus, vascularization was associated with the potential to produce progesterone (Acosta et al., 2003).

As in CL, uterine vascularization at D18 (diestrus) was significantly higher in the EB group; therefore, it did not follow the expected negative correlation pattern often observed between both. The presence of CL influences uterine resistance (IR) and pulsatility (IP) rates, which are often higher in animals without CL, thus indicating lesser blood perfusion (Wiltbank, 1994; Ginther et al., 2007). Similar results were observed by Rawy et al. (2018) in study conducted with dairy cows subjected to 10 mg of intramuscular EB application during the postpartum period. Animals were evaluated with the aid of color Doppler ultrasound, which showed increased blood flow volume and speed, as well as uterine artery diameter.

According to Hervé et al. (2006), the variability in VEGF system expression is associated with functional changes in animals' uterus and ovaries. Among the factors accounting for increasing VEGF expression, one finds ovarian steroid hormones (Hyder, 2002) and prostaglandins (Gately, 2000). VEGF expression in the diestrus subsequent to protocol application in the current study was significantly higher in animals treated with EB, and it may also explain the greater uterine vascularization observed at the same time. Therefore, the vascular effects of P4 resulted from its

stimulatory action in VEGF production (Sone et al., 1996; Hyder et al., 1998; Shikawa, 2003; Robinson et al., 2007). VEGF is highly mitogenic to endothelial cells (Kamat et al., 1995). This protein accounts for inducing endothelial cell proliferation, maturation and migration, as well as for inhibiting apoptosis. VEGF regulates angiogenesis, blood vessel permeability (Neufeld, 2000), as well as vascular development under normal (Cao et al., 1998; Fraser et al., 2000) and pathological conditions (Dvorak et al., 1991).

In addition, the BE+eCG group presented higher VEGF expression, which enabled inferring that the effects of the stimulation treatment with eCG have changed gene expression in the uterus in the short-term and, consequently, they modulated the blood perfusion pattern. VEGF expression can also be regulated by ovarian steroid hormones (Hyder, 2002), prostaglandins (Gately, 2000), FSH (Papa et al., 2007), hCG (Filicori et al., 2005) or by eCG itself (Shimizu et al., 2002), although eCG did not influence VEGF expression in the group treated with EC.

The EB group has also recorded higher OXTR gene expression, despite the fact that it presented lower E2:P4 ratio than that of animals treated with EC. However, the EB group recorded higher absolute E2 concentration in follicular fluid than that of EC ($1,637.50 \pm 14.3$ vs $1,500.00 \pm 12.3$; $P < 0.05$). Periovulatory E2 variations, as well as their interrelation with P4, are known to stimulate endometrial contractions mediated by increased oxytocin bonds to their receptor (McCracken et al., 1999; Robinson et al., 2001; De Fátima et al., 2013).

The PGR gene was more expressed when eCG was used in the protocols. This finding was again in compliance with the higher P4 concentration found in both follicular fluid (D10) and blood serum (D18). According to Souza et al. (2009), eCG promotes increase in the number of luteal cells, which account for approximately 80% of P4 synthesis and give it greater volume and steroidogenic capacity. Accordingly, Baruselli et al. (2000) has indicated eCG using as potential tool to improve plasma P4 concentrations in estrous cycles subsequent to TAI protocol applications.

These data have shown eCG effectiveness in increasing ovulation rates, as well as CL and circulating P4 volume in diestrus subsequent to TAI application - these conditions are essential to embryonic formation and survival (Sales et al., 2010; Sá filho et al., 2011; Nunez-Olivera et al., 2014; Baruselli et al., 2004a; Baruselli et al., 2004b; Baruselli et al., 2003; Marques et al., 2005; Silva et al., 2004; Rodrigues et al., 2004; Penteado et al., 2004).

Finally, the results of the present study corroborate the hypothesis that the different estradiol esters and eCG administration differentially regulate vascularization, steroidogenesis and utero-ovarian gene expression in *Bos indicus* cows submitted to TAI protocols.

Acknowledgment

The authors are grateful for the financial support provided by CAPES, as well as to Maranhão Research and Scientific and Technological Development Foundation (FAPEMA - Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão) for the financial support provided to this research and for granting the scholarship to the first author (Process BD-02775/17).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Acosta, T.J., Hayashi, K.G., Ohtani, M., Miyamoto, A, 2003. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*. 125,759–767.
- Ayres, H., Penteado, L., Torres - Junior, J. R. S., Souza, J. R., Baruselli, P. S, 2006. Taxa de concepção de vacas Nelore lactantes sincronizadas com implante auricular de progestágeno associado ao benzoato ou ao cipionato. *Acta. Sci. Vet.* 34, 410.
- Arruda, R. A., Visintin, J. A., Fleury, J. J., Garcia, A. R., Madureira, E. H., Celeghini, E. C. C., Neves Neto, J. R, 2001. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo

detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em, receptoras de embriões equinos? Braz. J. Vet. Res. An. Sci. 38, 233-239.

Baruselli, P. S., Marques, M. O., Carvalho, N. A. T., Valentim, R., Berber, R. C. A., Carvalho Filho, A. F., Madureira, E. H., Costa Neto, W. P, 2000. Dinâmica folicular em novilhas receptoras de embrião bovino submetidas à sincronização da ovulação para inovulação em tempo fixo. Arq. Fac. Vet. 28, 217.

Baruselli, P. S., Marques, M. O., Reis, E. L., Nasser, L. F. T., Silva, R. C. P, Menegatti, J. A., Valentin, R., Santos, I. C. C, 2003. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas Nelore (*Bos indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). Acta. Sci. Vet. 31, 244-245.

Baruselli, P.S., Reis, E.L., Marques, M.O., Nasser, L.F., Bo, G.A, 2004a The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. Ani. Reprod. Sci. 82, 479-486.

Baruselli, P.S., Reis, E.L., Carvalho, N.A.T., Carvalho, J.B.P, 2004b. Ecg increases ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: Proceedings of the XIV International Congress on Animal Reproduction, vol. 1, Porto Seguro, BA.

Baruselli, P. S., Sales, J. N. S., Sala, R. V., Vieira, L. M., Sá Filho, M. F, 2012. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. Anim. Reprod. 9, 139-152.

[Bazer, F. W., Song, G., Thatcher, W. W. 2012.](#) Roles of Conceptus Secretory Proteins in Establishment and Maintenance of Pregnancy in Ruminants. [Asian-Australas J Anim Sci.](#) 25 (1), 1–16.

Bó, G. A., Baruselli, P. S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H., Mapletoft, R. J, 2002. The control of follicular wave development for self-pointed embryo transfer programs in cattle. Theriogenology. 57, 53-72.

Bollwein, H., Baumgartner, U., Stolla, R, 2002. Transrectal Doppler sonography of uterine blood

flow in cows during pregnancy. *Theriogenology*. 57, 2053–2061.

Boos, A., Meyer, W., Schwarz, B. R., Grunert, A. E, 1996. Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 44, 11-21.

Cao, Y., Linden, P., Farnebo, J., Cao, R., Eriksson, A., Kumar, V., Qi, J. H., Claesson-Welsh, L., Alitalo, K, 1998. Vascular Endothelial Growth Factor C Induces Angiogenesis In Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14389-14394.

Castro Júnior, J. D., Sales, J. N. S., Crepaldi, G. A., Ayres, H., Ferreira, R. M., Baruselli, P. S, 2008. Efeito do tratamento com diferentes indutores da ovulação (cipionato e benzoato de estradiol) e do momento da inseminação artificial (48 e 54h após a retirada do implante de norgestomet) na taxa de prenhez de vacas nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. *Acta. Sci. Vet.* 36, 617.

Crepaldi, G.A. Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF. 2009. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Driancourt, M. A, 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55, 1211-1239.

Dvorak, H. F., Sioussat, T. M., Brown, L. F., Berse, B., Nagy, J. A., Sotrel, A., Manseau, E. J., Van De Water, L., Senger, D. R, 1991. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J. Exp. Med.* 174, 1275-1278.

Fatima, L. A., Baruselli, P. S., Gimenes, L. U., Binelli, M., Renno, F. P., Murphy, B. D., Papa, P. C, 2013. Global gene expression in the bovine corpus luteum is altered after stimulatory and superovulatory treatments. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 998-1001.

Ferreira, J. C., Gastal, E. L., Ginther, O. J, 2008. Uterine blood flow and perfusion in mares with

uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. *Reproduction*. 135, 541-550.

Filicori, M., Fazleabas, A. T., Huhtaniemi, I., Licht, P., Rao, C. V., Tesarik, J., Zygmunt, M. 2005. Novel concepts of human chorionic gonadotropin: reproductive system interactions and potential in the management of infertility. *Fertil. Steril.* 84, 275-284.

Ford, S. P., Chenault, J. R, 1981. Blood flow to the corpus luteum-bearing ovary and ipsilateral uterine horn of cows during the oestrous cycle and early pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 62, 555–562.

Ford, S. P, 1982. Control of uterine and ovarian blood flow throughout the estrous cycle and pregnancy of ewes, sows and cows. *J. Anim. Sci.* 55, 32–42.

Forde, N., Beltman, M. E., Duffy, G. B., Duffy, P., Mehta, J. P., O'gaora, P., Roche, J. F., Lonergan, P., Crowe, M. A, 2011. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biol. Reprod.* 84, 266-278.

Fraser, H. M., Dickson, S. E, Lunn, S. F., Wulff, C., Morris, K. D., Carroll, V. A., Bickenell, R, 2000. Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology*. 141, 995-1000.

Fuck, E. J., Moraes, G. V., Martins, E. N., Falcão, A. J. S., Rodrigues, C. M., Cardozo, R. M., Barros, C. M, 2002. Uso da gonadotrofina coriônica equina em receptoras de embriões para avaliar o incremento da progesterona endógena no dia da inovulação e sua correlação com a taxa de prenhez. *Acta. Sci.* 24, 1119-1126.

Gately, S, 2000. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis*. 19, 19-27.

Ginther, O. J, 1992. Reproductive biology of the mare. Basic and applied aspects. 2 ed, Equiservices, Cross Plains, Wisconsin, USA.

Ginther, O. J, 2007. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography. Book 4, Equiservices Publishing, Cross Plains, Wisconsin, USA.

- Ginther, O. J., Silva, L. A., Araujo, R. R., Beg, M. A, 2007. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂ α , luteal blood flow, and luteolysis in cattle. *Biol Reprod.* 76, 506-513.
- Ginther, O. J, 2009. A 40-year odyssey into the mysteries of equine luteolysis. *Theriogenology.* 72, 591-598.
- Greiss, F. C., Anderson, S. G, 1970. Effect of ovarian hormones on uterine vascular bed. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 107, 829-836.
- Hartt, L. S., Carling, S. J., Johnson, G. A., Vanderwall, D. K., Ott, T. L, 2005. Temporal and Spatial associations of oestrogen receptor α and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. *Reproduction.* 130, 241-250.
- Hervé, M. A., Meduri, G., Petit, F. G., Domet, T. S., Lazennec, G., Mourah, S., Perrot-Appanat, M, 2006. Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus. *J. Endocrinol.* 188, 91-99.
- Hyder, S. M, Murthy. L., Stancel, G. M, 1998. Progestin regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells. *Cancer. Res.* 58, 392-395.
- Hyder, S. M, 2002. The role of steroid hormones on the regulation of vascular endothelial growth factorm. *Am. J. Pathol.* 161, 345.
- Honnens, A., Niemann, H., Paul, V., Meyer, H. H. D., Bollwein, H, 2008. Doppler sonography of the uterine arteries during a superovulatory regime in cattle uterine blood flow in superovulated cattle. *Theriogenology.* 70, 859–867.
- Ishikawa, K., Ohba, T., Tanaka, N., Iqbal, M., Okamura, Y., Okamura, H, 2003. Organ-specific production control of vascular endothelial growth factor in ovarian hyper stimulation syndrome-model rats. *Endocr. J.* 50, 515-525.
- Kamat, B. R., Brown, L. F., Manseau, E. J., Senger, D. R., Dvorak, H. F, 1995. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am. J. Pathol.* 146, 157-165.

- Machado, R., Corrêa, R. F., Barbosa, R. T., Bergamaschi, M. A. C. M., 2008. Escore de condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste.
- Marques, M. O., Sá Filho, M. F., Gimenes, L. U., Figueiredo, T. B., Soria, G. F., Baruselli, P. S., 2005. Efeito do tratamento com PGF2 α na inserção e/ou tratamento com eCG na remoção do dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo em novilhas nelore. *Acta. Sci. Vet.* 1, 287-287.
- Mattioli, M., Barboni, B., Turriani, M., Galeati, G., Zannoni, A., Castellani, G., Berardinelli, P., Scapolo, P. A., 2001. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biol. Reprod.* 65, 1014–1019.
- Mccracken, J.A., Custer, E.E., Lamsa, J.C., 1999. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 79, 263-323.
- Mcdowell, K.J., Adams, M.H., Adam, C.Y., Simpson, K.S., 1999. Changes in equine endometrial oestrogen receptor α and progesterone receptor mRNAs during the o estrous cycle, early pregnancy and after treatment with exogenous steroids. *J. Reprod. Fertil.* 117, 135-142.
- Mesquita, F. S., Pugliesi, G., Scolari, S. C., França, M. R., Ramos, R. S., Oliveira, M., Papa, P. C., Bressan, F. F., Meirelles, F. V., Silva, L. A., Nogueira, G. P., Membrive, C. M., Binelli, M., 2014. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology.* 81, 861-869.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z., 2000. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Faseb. J.* 13, 9-22.
- Nunez, Olivera, R., Castro, T., Garcia, Pintos, C., Bó, G., Piaggio, J., Menchaca, A., 2014. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol based treatment in postpartum anestrous beef cattler. *Anim. Reprod. Sci.* 146, 111-116.
- Okumu, L. A., Forde, N., Fahey, A. G., Fitzpatrick, E., Roche, J. F., Crowe, M. A., Lonergan P., 2010. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and

localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *Reproduction*. 140, 143–153.

Papa, P. C., Moura, C. E., Artoni, L. P., Fátima, L. A., Campos, D. B., Marques, J. E., Baruselli, P. S., Binelli, M., Pfarrer, C., Leiser, R, 2007. VEGF system expression in different stages of estrous cycle in the corpus luteum of non-treated and superovulated water buffalo. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33, 379-389.

Penteado, L., Ayres, H., Madureira, E. H., Reis, E.L., Baruselli, P. S, 2004. Efeito do eCG e do desmame temporário na taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes inseminadas em tempo fixo. *Acta. Sci. Vet.* 32, 223.

Penteado, L., Ayres, H., Torres - Júnior, J. R. S., Souza, A. H., Baruzelli, P. S, 2006. Taxa de concepção de vacas Nelore lactantes sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona associado ao benzoato ou cipionato de estradiol. *Acta. Sci. Vet.* 34, 401.

Pereira, C.H., Gottschall, C.S., Mattos, R.C., Evangelista, G.T., Silva, B.V.C., Jobim, M.I.M, Gregory, R.M, 2011. Luteólise antecipada em protocolo de inseminação artificial em tempo fixo com progesterona em vacas no pós-parto. *Vet. Notícias.* 17, 42-49.

Price, C. A., Carriere, P. D., Gosselin, N., Kohram, H., Guilbault, L. A, 1999. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. *Theriogenology.* 51, 37-46.

Rawy M, Mido S, Ali He, Derar D, Megahed G, Kitahara G, Osawa T, 2018. Effect of exogenous estradiol Benzoate on uterine blood flow in postpartum dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 192, 136-145.

Robinson, R.S., Mann, G.E., Lamming, G.E., Wathes, D.C, 2001. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *J. Reprod. Fertil.* 122, 965-979.

Robinson, R. S., Nicklin, L. T., Hammond, A. J., Schams, D., Hunter, M. G., Mann, G. E, 2007. Fibroblast growth factor 2 is more dynamic than vascular endothelial growth factor A during the

follicle-luteal transition in the cow. *Biol. Reprod.* 77, 28-36.

Rodrigues, C.A., Ayres, H., Reis, E.L., Madureira, E. H., Baruselli, P. S. 2004. Aumento da taxa de prenhez em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com uso de eCG em diferentes períodos pós-parto. In: XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, Barra Bonita. *Acta. Sci. Vet.* 32, 220.

Roman-Ponce, H., Thatcher, W. W., Caton, D., Barron, D. H., Wilcox, C. J, 1978. Thermal-stress effects on uterine blood-flow in dairy-cows. *J. Anim. Sci.* 46, 175–180.

Roman-Ponce, H., Caton, D., Thatcher, W. W, Lehrer, R, 1983. Uterine blood flow in relation to endogenous hormones during estrous cycle and early pregnancy. *Am. J. Physiol.* 245, 843-849.

Sá Filho, M. F., Santos, J. E. P., Ferreira, R. M., Sales, J, N. S., Baruselli, P. S, 2011. Importance of estrus on pregnancy submitted to estradiol/progesterone- based timed insemination protocols. *Theriogenology.* 76, 455-463.

Sá Filho, M. F., Torres - Júnior, J. R. S., Penteado, L., Gimenes, L. U., Ferreira, R. M., Ayres, H. 2010. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 2-4.

Sá Filho M.F, Gonella-Diaza A.M, Sponchiado M, Mendanha M.F, Pugliesi G, Ramos R.S, Andrade S.C.S, Gas-parin G, Coutinho L.L, Goissis M.D, Mesquita F.S, Baruselli P.S, Binelli M, 2017. Impact of hormonal modulation at proestrus on ovarian responses and uterine gene expression of suckled anestrous beef cows. *J. Anim. Sci. Biotechno.* 8,1-14.

Sagsöz, B. G., Saruhan, H, 2011. The expression of vascular endothelial growth factor and its receptors (flt1/fms, flk1/KDR, flt4) and vascular endothelial growth inhibitor in the bovine uterus during the sexual cycle and their correlation with serum sex steroids H. *Theriogenology.* 75, 1720–1734.

Sales, J.N.S., Carvalho, J.B.P., Crepaldi, G.A., Maio, J.R.G., Carvalho, C.A.B., Baruselli, P.S, 2008. Rate and timing of ovulation in Nelore cows treated with estradiol cypionate or benzoate to induce ovulation on FTAI protocols. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 181.

- Sales, J. N. D. S., Crepaldi, G. A., Giroto, R. W., Souza, A. H., Baruselli, P. S, 2011. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 12-18.
- Sales, J. N. S., Carvalho, J. B. P., Crepaldi, G. A., Cipriano, R. S., Jacomini, J. O., Maio, J. R. G., Baruselli, P. S, 2012. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*. 78, 510-516.
- Sampaio, I.B.M, 2002. Estatística aplicada à experimentação animal. 2. ed. FEPMVZ. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.
- Shimizu, T., Jiang, J. Y., Sasada, H., Sato, E, 2002. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. *Biol. Reprod.* 67, 1846-52.
- Shimizu, T., Krebs, S., Bauersachs, S., Blum, H., Wolf, E., Miyamoto, A. 2010. Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine Endometrium. *Physiol Genomics*. 42, 290-300.
- Silva, R. C. P., Rodrigues, C. A., Marques, M. O., Ayres, H., Reis, E. L., Nichi, M., Madureira, E. H., Baruselli, P. S, 2004. Efeito do eCG e do GnRH na taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes inseminadas em tempo fixo. *Acta. Sci. Vet.* 32, 221.
- Silva, L.A., Gastal, E.L., Beg, M.A., Ginther, O.J, 2005. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. *Biol. Reprod.* 72, 755–61.
- Silva, L. A., Ginther, O. J, 2010. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. *Reproduction*. 139, 453-463.
- Sone, H., Okuda, Y., Kawakami, Y., Hanatani, M., Suzuki, H., Kozawa, T., Honmura, S., Yamashita, K, 1996. Vascular endothelial growth factor level in aqueous humor of diabetic

patients with rubeotic glaucoma is markedly elevated. *Diabetes Care*. 19, 1306-1307.

Souza, A. H., Viechnieski, S., Lima, F. A., Silva, F. F., Araujo, R., Bo, G. A., Wiltbank, M. C., Baruselli, P. S, 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology*. 72, 10-21.

Statistical Analysis System - SAS. System for Microsoft Windows: release 8.2. Cary: 2001.

Svensson, K., Just A. C., Fleisch, A. F., Sanders, A. P., Tamayo-Ortiz, M., Baccarelli, A. A., Wright, R., Téllez-Rojo, M. M., Wright, R., Burris, H. H. 2019. Prenatal salivary sex hormone levels and birth weight-for-gestational age. *J Perinatol*. 39(7):941–948.

Torres - Júnior, J. R. S., Penteado, L., Sales, J. N. S., Sá Filho, M. F., Ayres, H., Baruselli, P. S. A, 2014. Comparison of two different esters of estradiol for the induction of ovulation in an estradiol plus progestin-based timed artificial insemination protocol for suckled *Bos indicus* beef cows. *Anim. Reprod. Sci*. 151, 9-14.

Vynckier, L., Debackere, M., De Kruif, A., Coryn, M, 1990. Plasma estradiol-17 β concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 β benzoate and estradiol-17 β cypionate-a preliminary study. *J. Vet. Pharmacol. Ther*. 13, 36-42.

Torres-Júnior, J.R.S, Pires, M.F.A., Sá, W. F., Ferreira, A. M., Viana, J. H. M., Camargo, L. S. A., Ramos, A. A., Folhadella, I. M., Polisseni, J., Freitas, C., Clemente, C.A.A., Sá Filho, M. F., Paula-Lopes, F.F., Baruselli, P. S. 2008. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 69, 155-166.

Wang, N., Wang, Y., Hao, H, Wang, L., Wang, Z., Wang, J., Wu, R. 2014. A bi-Poisson model for clustering gene expression profiles by RNA-seq. *Brief Bioinform*. 15(4), 534-41.

Watson, E.D., Skolnik, S.B., Zanecosky, H.Z, 1992. Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. *Theriogenology*. 38, 575- 580.

Watson, E.D., Heald, M., Tsigos, A., Leask, R., Steele, M., Groome, N.P., Riley, S.C, 2003. Plasma FSH, inhibin A, and inhibin isoforms containing pro- and dC during winter anestrus, spring transition, and the breeding season in mares. *Reproduction*. 123, 535–542.

- Wen, L., Chen, L. H., Li, H. Y., Chang, S. P., Liao, C. Y., Tsui, K. H., Sung, Y. J., Chao, K. C., 2009. Roles of estrogen and progesterone in endometrial hemodynamics and vascular endothelial growth factor production. *J. CHIN. MED. ASSOC.* 72, 188–193, 2009.
- Wiltbank, M. C., 1994. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid cycle corpus luteum function. *J. Anim. Sci.* 72, 1873-1883.
- Wiltbank, M. C., Pursley J. R., 2014. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology*, 81, 170-185.

Table 1. Dominant follicle diameter (mm) at protocol application days eight (D8), nine (D9) and ten (D10); and number and diameter of corpus luteum at day eighteen (D18) (mean $\pm$ SEM), in Nelore (*Bos indicus*) cows subjected to ovulation induction protocol based on EC or EB, in association, or not, with eCG.

Variable	EB		EC		<i>P-value</i>		
	eCG	No eCG	eCG	No eCG	E2	eCG	E2 x eCG
n	10	10	10	10	-	-	-
DF diameter at D8 (mm)	10.2 $\pm$ 0.8	10.3 $\pm$ 0.8	9.7 $\pm$ 0.6	9.9 $\pm$ 0.8	0.5273	0.8571	0.9521
DF diameter at D9 (mm)	11.5 $\pm$ 0.7	10.8 $\pm$ 0.8	11.7 $\pm$ 0.6	10.7 $\pm$ 0.9	0.9071	0.2990	0.8914
DF diameter at D10 (mm)	12.1 $\pm$ 0.7	12.2 $\pm$ 0.8	13.3 $\pm$ 0.6	11.8 $\pm$ 0.8	0.6058	0.4059	0.3047
CL diameter at D18 (mm)	17.4 $\pm$ 1.3	17.0 $\pm$ 1.4	15.5 $\pm$ 2.9	15.2 $\pm$ 3.1	0.3290	0.3956	0.3936
Ovulation rate*	70% (7/10) ^{ab}	80% (8/10) ^{ab}	100% (10/10) ^a	50%(5/10) ^b	0.1000	0.2700	---

* ovulation rate; featured by the identification of corpus luteum at D18; analyzed through Fisher's exact test.

^{ab} Means followed by different superscripts on the same line significantly differ from each other, based on the Duncan test, at 5% significance level.

EB = estradiol benzoate; EC = estradiol cypionate; eCG = equine chorionic gonadotropin.

Table 2. Vascularized uterus and ovarian structure area rate (%) at protocol application days eight (D8), nine (D9), ten (D10) and eighteen (D18) (mean $\pm$ SEM), in Nelore (*Bos indicus*) cows subjected to ovulation induction protocol based on EC or EB, in association, or not, with eCG.

Variables	EB		EC		P-value		
	eCG	No eCG	eCG	No eCG	E2	eCG	E2 x eCG
n	10	10	10	10	-	-	-
Uterine vascularization area at D8 (%)	9.8 $\pm$ 0.9	11.9 $\pm$ 1.0	12.3 $\pm$ 1.1	11.9 $\pm$ 1.0	0.2334	0.3958	0.2334
Uterine vascularization area at D9 (%)	18.0.9 $\pm$ 1.3 ^a	10.7 $\pm$ 1.3 ^b	19.7 $\pm$ 3.9 ^a	18.2 $\pm$ 3.3 ^a	0.0006	0.0008	0.0117
Uterine vascularization area at D10 (%)	16.3 $\pm$ 1.3 ^{ab}	19.9 $\pm$ 1.5 ^a	17.6 $\pm$ 1.0 ^{ab}	15.5 $\pm$ 1.2 ^b	0.2714	0.6443	0.0420
Uterine vascularization area at ???(%)	15.8 $\pm$ 1.2 ^a	12.4 $\pm$ 1.2 ^{ab}	11.4 $\pm$ 1.1 ^b	11.5 $\pm$ 1.1 ^b	0.0315	0.2120	0.1800
DF vascularization area at D8 (%)	12.1 $\pm$ 1.1 ^b	11.6 $\pm$ 1.0 ^b	16.9 $\pm$ 1.3 ^a	8.7 $\pm$ 0.9 ^c	0.8035	0.0005	0.0019
DF vascularization area at D9 (%)	15.5 $\pm$ 1.2 ^a	10.7 $\pm$ 1.0 ^b	10.9 $\pm$ 1.0 ^b	12.8 $\pm$ 1.1 ^{ab}	0.3461	0.2540	0.0058
DF vascularization area at D10 (%)	15.0 $\pm$ 1.2 ^a	10.3 $\pm$ 1.0 ^b	11.2 $\pm$ 1.1 ^b	10.9 $\pm$ 1.0 ^b	0.2231	0.0384	0.0740
CL vascularization area at D18 (%)	40.0 $\pm$ 2.5 ^a	43.5 $\pm$ 2.3 ^a	32.5 $\pm$ 1.8 ^b	38.7 $\pm$ 3.1 ^{ab}	0.0192	0.0549	0.4816

^{ab} Means followed by different superscripts on the same line significantly differ from each other, based on the Duncan test. at 5% significance level.

EB = estradiol benzoate; EC = estradiol cypionate; eCG = equine chorionic gonadotropin.

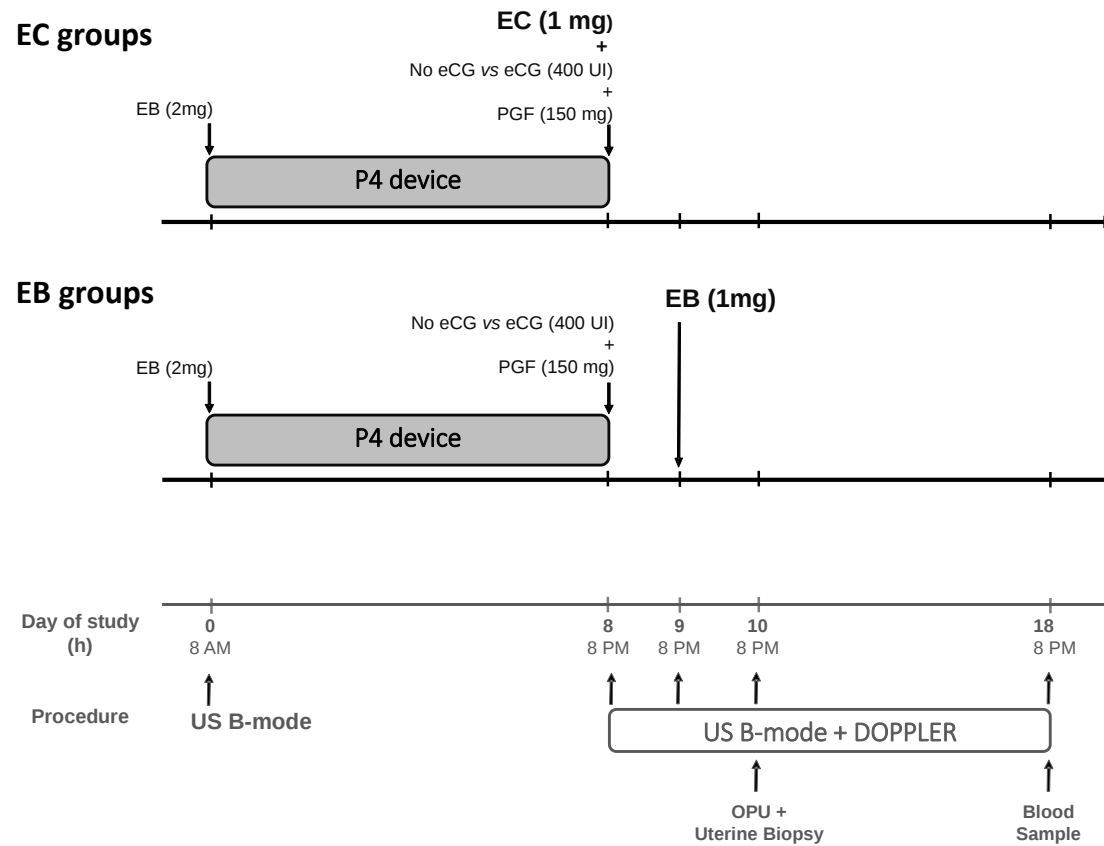


Figure 1. Schematic view of TAI protocol and proceedings following ovulation synchronization in Nelore (*Bos indicus*) cows subjected to ovulation induction protocol based on EC or EB, in association, or not, with eCG.

US B-mode = ultrasound examination in bidimensional mode (grey-scale); DOPPLER = ultrasound examination in Color-Doppler mode; EC = estradiol cypionate; EB = estradiol benzoate; OPU = ovum pickup / ultrasound-guided aspiration of follicular fluid *in vivo*.

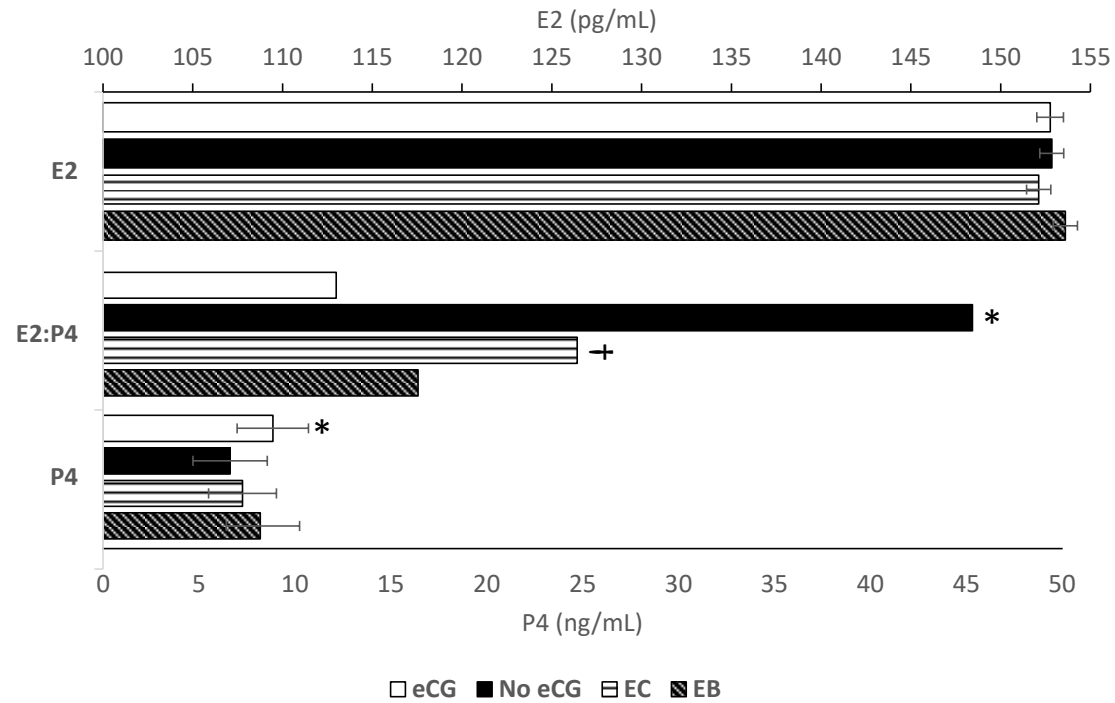


Figure 2. Main effects of estradiol ester and eCG administration on P4 and E2 concentrations in blood serum (D18) and on E2: P4 ratio in follicular fluid (D10) of Nelore cows synchronized to TAI. Values are expressed as mean $\pm$ SEM

* Significant difference between eCG vs No eCG ($P < 0.05$).

† Significant difference between EB vs EC ($P < 0.05$).

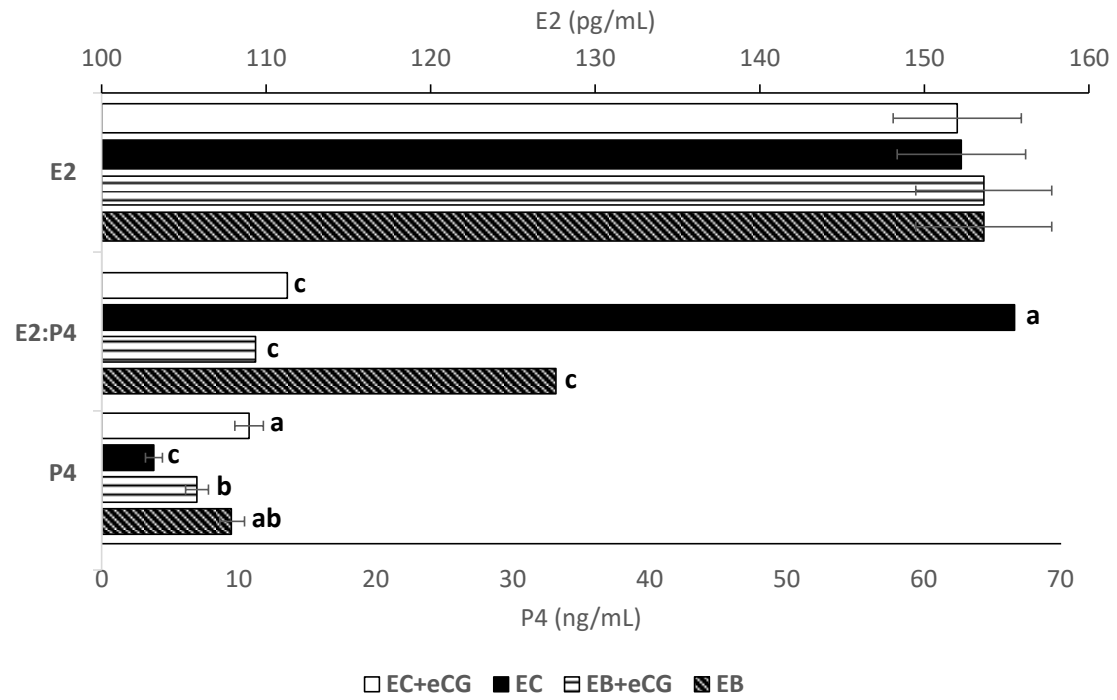


Figure 3. Effects of treatments with EB and EC, in association, or not, with eCG, on P4 and E2 blood serum concentrations (D18) and on E2: P4 ratio in the follicular fluid (D10) of Nelore cows synchronized to TAI. Values are expressed as mean $\pm$ SEM

^{abc}Different letters indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

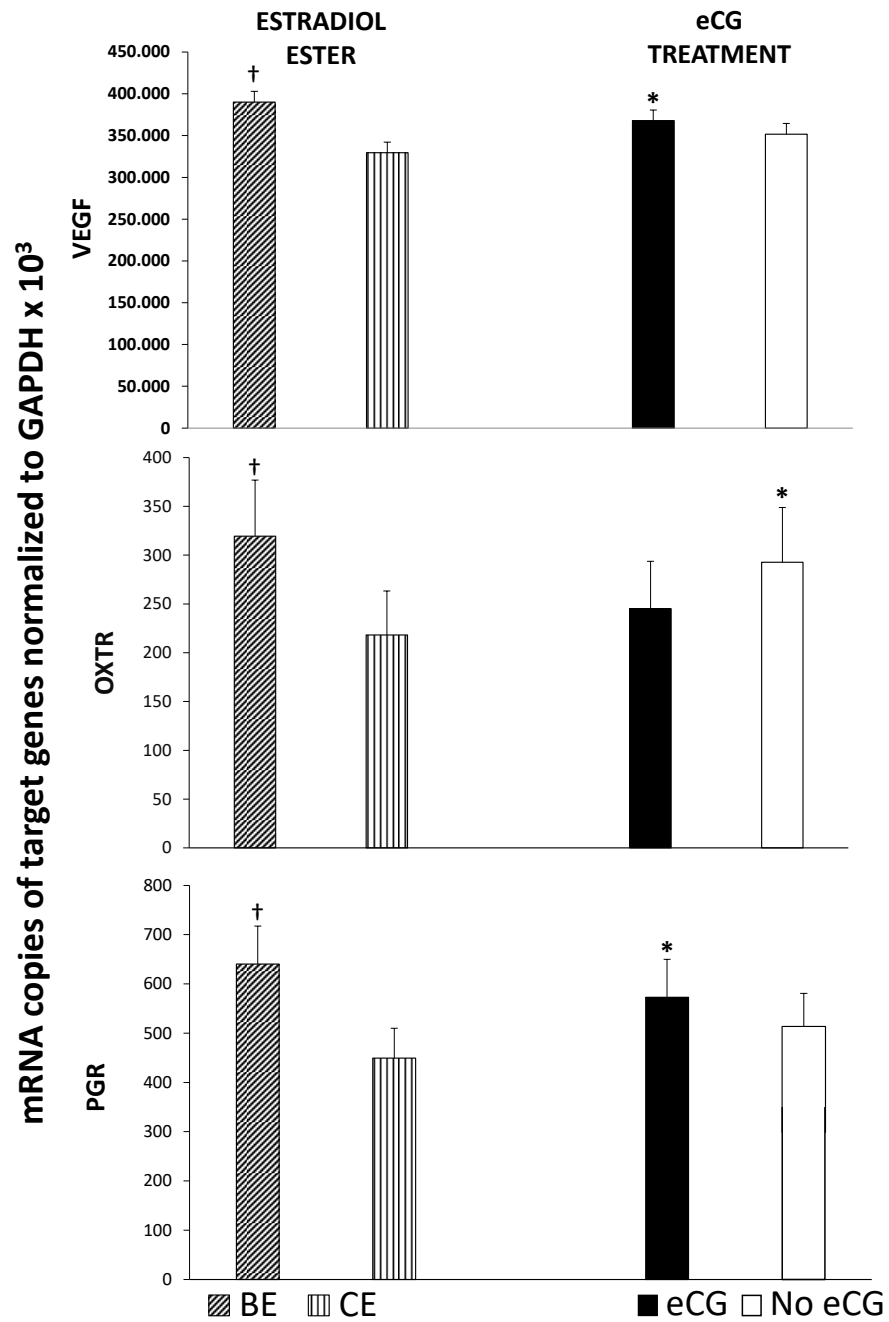


Figure 4. Main effects of estradiol ester and eCG administration on the endometrial expression of VEGF, OXTR and PGR at day ten (D10) of protocol application to Nelore cows synchronized to TAI. Values are expressed as mean $\pm$ SEM.

* Significant difference between eCG vs No eCG ($P < 0.05$).

† Significant difference between EB vs EC ($P < 0.05$).

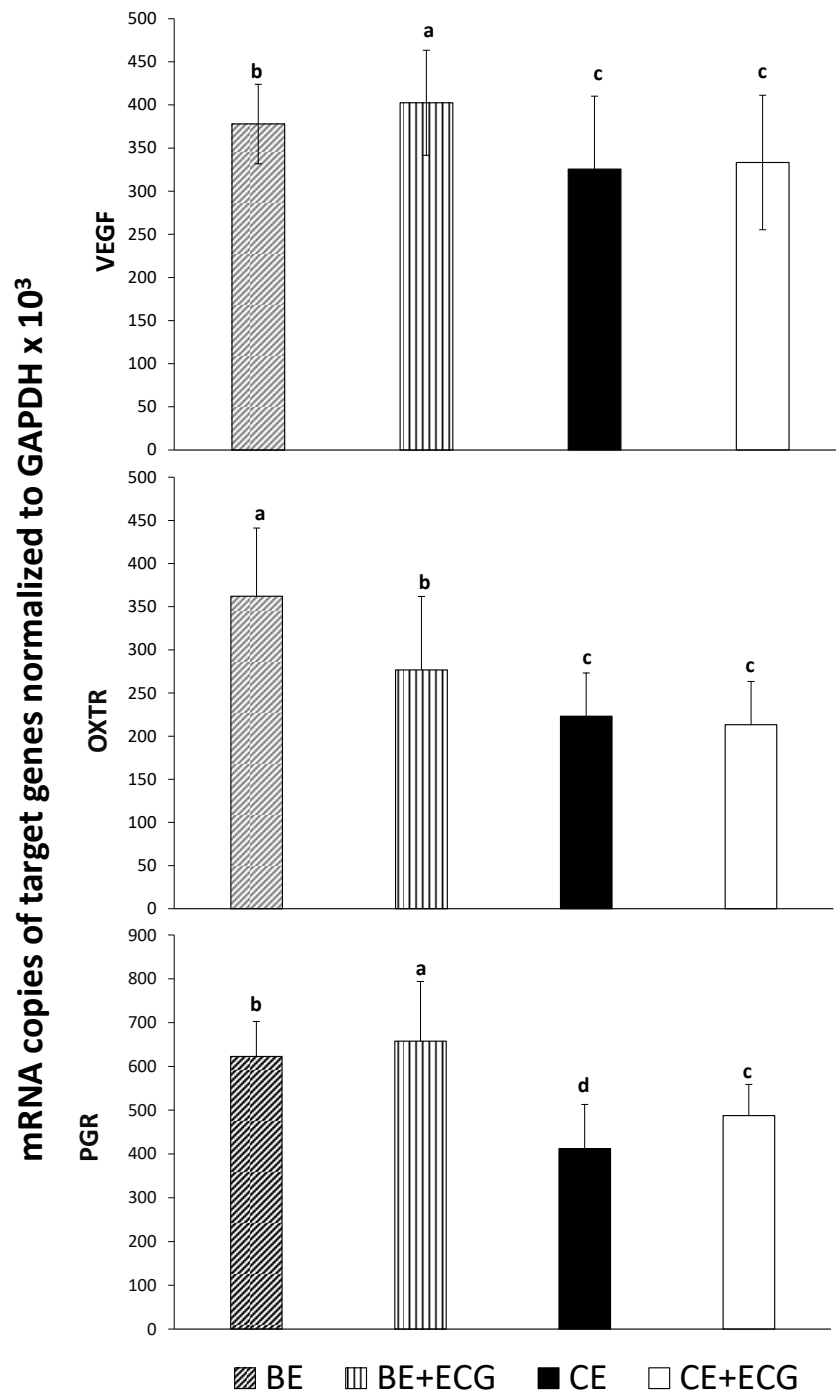


Figure 5. Effects of treatments with BE, BE+eCG, CE or CE+eCG on the endometrial expression of VEGF, OXTR and PGR at day ten (D10) of protocol application to Nelore cows synchronized to TAI. Values are expressed as mean $\pm$ SEM.

^{abc}Different letters indicate significant difference between treatments (P<0.05).

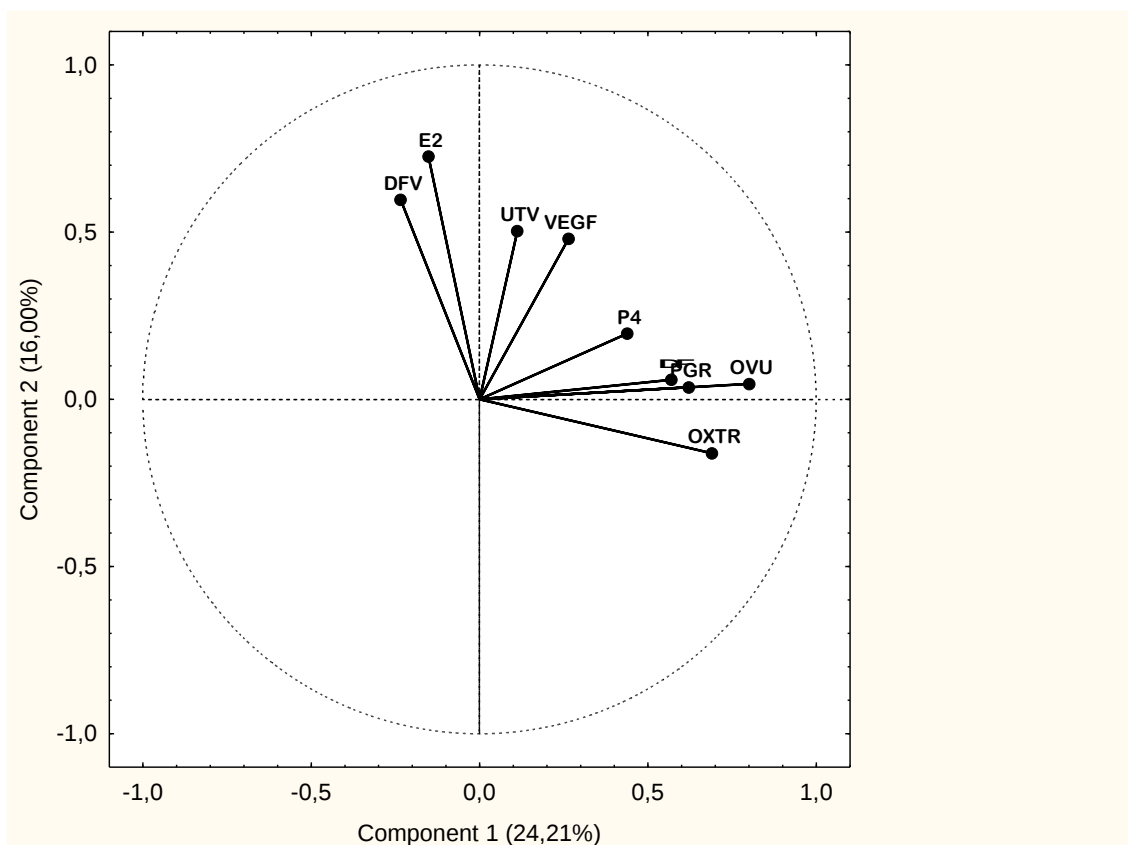


Figure 6. Biplot of Principal Component Analysis (PCA) applied to the association between variables, based on B-mode and Doppler ultrasonography, sex steroid concentrations in follicular fluid and uterine gene expression in Nelore cows (*Bos indicus*) subjected to synchronization protocol with different estradiol esters and to eCG using. OVU = ovulation rate; DF = dominant follicle diameter; DFV = dominant follicle vascularization; UTV = uterine vascularization; E2 = estradiol concentrations in follicular fluid; P4 = progesterone concentrations in follicular fluid; VEGF = endometrial expression of vascular endothelial growth factor gene; OXTR = endometrial expression of oxytocin receptor gene; PGR = endometrial expression of progesterone receptor gene.

1. Sequence of genes and primers used in RT-PCR.

Gene	Tissue / associated function	Primers (5'-3')	NCBI sequence of reference
GAPDH	Endogenous Gene of reference	5'- GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG-3' 3'-CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA-5'	NM_001034034.1
PGR	Endometrial gene	5'-GCCGCAGGTCTACCAGCCCTA-3' 3'-GTTATGCTGTCCTTCCATTGCCCTT-5'	NM_001205356.1
VEGF	Endometrial gene	5'-GCCATGGAGCGCTTTGG-3' 3'-CCACAGTCAGCAATGGTGATCT-5'	NM_174216
OTR	Endometrial gene	5'-AAGATGACCTTCATCGTCGTG-3' 3'-CGTGAAGAGCATGTAGATCCAG-5'	NM_174134.2