

Efeito da expressão do estro sobre características morfofuncionais foliculares, luteais e fertilidade em fêmeas *Bos indicus* sincronizadas para IATF

Effect of the Estrus Expression on Follicular and Luteal Morphofunctional Characteristics and Fertility in *Bos indicus* Females Synchronized for FTAI

Artur Azevedo Menezes¹, Lucas André Silva Batista¹, Aldo Barbosa Sousa¹, Marcus Vinícius Galvão Loiola², Rodrigo Freitas Bittencourt², Antonio de Lisboa Ribeiro Filho² & Alexandra Soares Rodrigues¹

ABSTRACT

Background: Recent studies have been conducted with the aim of improving the fertility rates in the FTAI programs in beef females. The observation of the estrus expression constitutes an important indicator of fertility in zebu females. Therefore, this work has as an objective to evaluate the impact of the estrus expression on the follicular, luteal and fertility morphofunctional characteristics of Nelore females synchronized for FTAI.

Materials, Methods & Results: Sixty five lactating female Nelore (*Bos taurus indicus*) were used. On a random day, denominated day 0 (D0), the 65 Nelore females received a progesterone-releasing device associated to the application of 2.0 mg of estradiol benzoate intramuscularly (IM). On D9, the progesterone-releasing intravaginal devices were removed and was administered 500 µg of cloprostenol sodium IM; 0.6 mg of estradiol cypionate IM and 300 UI of Equine Chorionic Gonadotropin IM. At this point, the animals were marked with a marking stick for the determination of the estrus expression. On D11 of the synchronization protocol, the animals were characterized in two groups: without estrus expression WITHOUT ESTRUS and with estrus expression WITH ESTRUS. The evaluation of the follicle diameter (FOLD), of the follicle wall area (FOLA), of the follicle wall vascularization (FOLV) and the percentage of vascularization in the area of the preovulatory follicle wall (%FOLV) were conducted on D11 using B-mode ultrasonography and color Doppler and then the artificial inseminations were performed. The evaluation of the corpus luteum diameter (CLD), the total area of the corpus luteum (CLA), of the area of vascularization of the corpus luteum (CLV), of the percentage of vascularization of the in the area of the corpus luteum (% CLV) and the collection of blood for the evaluation of the serum levels of progesterone were carried out on D24. The analysis of the serum progesterone concentration were performed by the chemiluminescence method using the Access immunoassay systems Progesterone, with a sensitivity of 0.1 ng/mL. The diagnosis of gestation was carried out by transrectal ultrasonography on D45. The animals of the WITH ESTRUS group presented superior FOLD, FOLA, FOLV ($P < 0.05$) averages to those presented by the cows of the WITHOUT ESTRUS group. In relation to the luteal characteristics, in the WITH ESTRUS group the cows exhibited averages for CLD, CLA, CLV and P4 significantly higher than those of the WITHOUT ESTRUS group. However, the bovines of the WITH ESTRUS group presented a % CLV similar to the presented by the females of the WITHOUT ESTRUS group. As for the fertility rates, there was difference between the experimental groups WITH ESTRUS and WITHOUT ESTRUS.

Discussion: The present work demonstrated the impact of the estrus expression on the follicular morphological parameters, therefore in accordance with other studies. These authors show a relation between the estrus expression and levels of estradiol, which is directly related to the sperm transport in the female reproductive tract, oocyte maturation and fertilization directly affecting the fertility of females submitted to the FTAI program. Similarly, there was an interrelation between the estrus expression and the luteal morphological parameters, corroborating with the findings of some researches, where were verified higher luteal morphological parameters associated to higher conception rates in cows that demonstrated estrus behavior in the FTAI. Therefore, the estrus detection can be used as a tool to direct matings in synchronization protocols, promoting the identification of the animals with a higher probability of conception, owing to better follicular and luteal hemodynamic conditions.

Keywords: estrus detection, doppler, artificial insemination, synchronization.

Descritores: detecção do estro, doppler, inseminação artificial, sincronização.

DOI: 10.22456/1679-9216.107435

Received: 12 September 2020

Accepted: 12 January 2021

Published: 28 February 2021

¹Multidisciplinary Center of the Barra Campus, Federal University of West Bahia (UFOP), Barra, BA, Brazil. ²School of Veterinary Medicine and Zootecnics (EMEVZ), Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, BA. CORRESPONDENCE: A.A. Menezes [arturmenezes76@gmail.com]. Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOP) - Campus Barra. Av. 23 de Agosto n. 860. CEP 47100-000 Barra, BA, Brazil.

INTRODUÇÃO

Nos modernos sistemas de produção, a inserção de biotecnologias reprodutivas torna-se essencial para maximizar a eficiência do rebanho, proporcionando o desenvolvimento de uma empresa pecuária economicamente sólida. Dentre as técnicas de reprodução assistida, destaca-se a IATF [7]. Pesquisas recentes definiram a sequência, a dosagem e o período de realização dos tratamentos hormonais, entretanto, apesar da evolução nos programas de IATF, as taxas de concepção encontram-se entre 40 a 50% [9].

Diante deste cenário, é necessário compreender os mecanismos que podem otimizar o sucesso da concepção na IATF [7]. Algumas pesquisas observaram um maior diâmetro folicular e fertilidade nas fêmeas que demonstraram comportamento de estro antes da inseminação artificial propriamente dita [1,5,49]. Estudos recentes sugerem que a expressão de estro pode ser um fator que afeta as características morfofuncionais foliculares e luteais [34,35,43,46]. A junção entre os efeitos do comportamento do estro no período folicular e luteal cria um ambiente endócrino favorável à concepção, devido ao aumento na expressão de fatores responsáveis pela sinalização da gestação para os tecidos maternos [17].

Diante da escassez de relatos que venham a comprovar a relação entre a expressão de estro e o fluxo sanguíneo folicular e luteal, associada a possibilidade de utilizar estas características como ferramentas para direcionar acasalamentos, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da expressão do estro sobre os parâmetros morfofuncionais foliculares e luteais, assim como os índices de fertilidade de fêmeas Nelore submetidas a um programa para IATF.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado durante os meses de agosto de 2019 até julho de 2020, na Fazenda Belo Horizonte, localizada no município de Barra, região oeste da Bahia. A propriedade adotava um sistema extensivo de criação de animais em pastagem, com suplementação mineral e água *ad libitum*.

Foram utilizadas 65 fêmeas Nelore lactantes (*Bos taurus indicus*) pertencentes à categoria pluríparas, idade de 5 a 6 anos, escore de condição corporal (ECC) de 3, avaliado utilizando-se a escala de 1 a 5 [50].

Previamente, ao início do protocolo de IATF, os animais foram submetidos ao exame clínico-ginecológico

e ultrassonografia transretal, utilizando-se um transdutor linear com frequência de 5,0 Mhz (S2 VET®)¹, sendo considerados aptos, a participarem do experimento, os animais que apresentaram ausência de anormalidades do trato reprodutivo e sem histórico de aborto.

Os animais foram submetidos ao seguinte protocolo de sincronização: em um dia aleatório do ciclo estral denominado dia 0 (D0) receberam um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona associado a 2,0 mg de Benzoato de Estradiol (Gonadiol®)² por via intramuscular (IM). No dia nove (D9) foi realizada a remoção dos dispositivos intravaginais de progesterona (DIB®)² e aplicou 500 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio®)³ IM; 0,6 mg de cipionato de estradiol (ECP®)² IM e 300UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (Novormon®)¹ IM. Os animais foram marcados com bastão marcador (RAIDEX)⁴ entre a tuberosidade sacral e a inserção da cauda para determinação da expressão do estro.

No dia 11 (D11) do protocolo de sincronização, os animais foram caracterizados em dois grupos experimentais de acordo com a expressão do estro verificada pela remoção da tinta do bastão marcador: Grupo Sem expressão do estro (SEM ESTRO) - permanência da cor ou perda parcial da intensidade da tinta e Grupo com expressão do estro (COM ESTRO) - remoção completa da cor e intensidade da tinta.

Além disso, os ovários foram localizados e avaliados por ultrassonografia em modo B, e a imagem do maior folículo foi congelada para determinação do diâmetro do folículo pré-ovulatório (DFOL) e da área total da parede do folículo pré-ovulatório (AFOL). Posteriormente, realizou o cálculo da área de vascularização utilizando o cursor para se determinar a área de vascularização na parede do folículo (VFOL). O percentual de vascularização na área da parede do folículo pré-ovulatório (%VFOL) foi obtido pela razão entre a área de vascularização e área total da parede folicular.

Imediatamente, após a caracterização das vacas e avaliação das características foliculares, foram realizadas as IATFs, para tanto se utilizou sêmen criopreservado comercializado de um único touro da raça Nelore que se enquadrou dentro dos padrões mínimos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [16]. No momento da IA, o sêmen foi descongelado a 37°C por 30 s e as inseminações foram efetuadas pelo mesmo técnico.

No dia 24 (D24), após a localização do ovário ovulatório, o mesmo foi analisado por ultrassonografia

em modo B, sendo a imagem do CL congelada para mensuração do diâmetro do CL (DCL) e da área total do CL (ACL). Nos CLs cavitários, a área da cavidade foi calculada e subtraída da área total do CL. Para o cálculo da área de vascularização utilizou o cursor para verificar a VCL. A determinação do percentual de vascularização na área do CL (%VCL) foi realizada por meio da razão entre a área de vascularização e área total do CL.

As concentrações séricas de progesterona pós-ovulatória foram mensuradas no D24 do protocolo de sincronização. As coletas foram realizadas por meio da punção venosa coccígea. Todas as amostras foram coletadas em tubos de vácuo de 10 mL sem anticoagulante (Vacutainer®)⁵ e imediatamente refrigeradas em isopor contendo gelo mantido em média a 4°C.

As análises da concentração de progesterona foram realizadas pela metodologia de quimioluminescência utilizando o imunoensaio *Access immunoassay systems Progesterone*, conforme especificações do fabricante no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia, com uma sensibilidade de 0,1 ng/mL. Realizou-se dois ensaios e os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram de 6,2% e 3,5%, respectivamente.

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal no dia 45 (D45). Foi considerado diagnóstico de gestação positivo, os animais com presença de uma vesícula embrionária visível com batimento cardíaco. A taxa de concepção foi calculada através da divisão do número de animais gestantes pelo número de animais inseminados.

Análise estatística

Os dados foram processados por um programa comercial (SPSS, 19)⁷ com nível de significância de

5%. Para tanto, realizou-se a seguinte sequência de análises: 1- A média e desvio-padrão das variáveis de interesse ao estudo serão obtidos por meio da análise descritiva; 2- As diferenças dos parâmetros morfológicos foliculares (DFOL, VFOL e %VFOL) e características morfofuncionais do corpo lúteo (DCL, VCL, %VCL e P4) entre os animais COM ESTRO e SEM ESTRO foram comparadas por meio do teste *t* de Student; 3- A taxa de concepção entre os grupos COM ESTRO e SEM ESTRO foi comparada empregando um estudo de dispersão de frequências pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).

RESULTADOS

No presente trabalho, 41,53% das fêmeas (27/65) não expressaram estro e 58,46% (38/65) demonstraram expressão estro. Os animais do grupo COM ESTRO esboçaram um DFOL, AFOL, VFOL superior ($P < 0,05$) as médias apresentadas pelas vacas do grupo SEM ESTRO (Tabela 1 e Figura 1). No entanto, o %VFOL demonstrou tendência ($P = 0,09$) entre as médias das fêmeas do grupo COM ESTRO e SEM ESTRO (Tabela 1).

No que se refere as características luteais, no grupo COM ESTRO as vacas exibiram médias para DCL, ACL, VCL e P4, significativamente mais elevadas que no grupo SEM ESTRO, conforme representado na Tabela 2 e Figura 2. Contudo, os bovinos do grupo COM ESTRO apresentaram %VCL semelhante àquele apresentado pelas fêmeas do grupo SEM ESTRO (Tabela 2 e Figura 2).

Quanto aos índices de fertilidade, de um total de 65 animais, 31 ficaram gestantes perfazendo uma taxa de concepção de 47,7%. Houve diferença entre os grupos experimentais COM ESTRO e SEM ESTRO, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 1. Resultados da média e desvio padrão (S) do diâmetro folicular (DFOL), da área da parede folicular (AFOL), da área de vascularização da parede folicular (VFOL) e do percentual de vascularização do foliculo (%VFOL) de acordo com a expressão do estro de fêmeas bovinas Nelore submetidas a um Programa para Inseminação Artificial em Tempo Fixo.

Grupo experimental	DFOL	AFOL	VFOL	%VFOL
	Média ± S (cm)	Média ± S (cm)	Média ± S (cm)	Média ± S (%)
SEM ESTRO	0,98 ± 0,24 ^b	0,32 ± 0,09 ^b	0,13 ± 0,07 ^b	41,27 ± 16,77
COM ESTRO	1,23 ± 0,18 ^a	0,43 ± 0,13 ^a	0,22 ± 0,11 ^a	49,13 ± 17,24
TOTAL	1,12 ± 0,24	0,39 ± 0,13	0,18 ± 0,10	46,07 ± 17,35

^{a,b}Letras distintas dentro das colunas indicam diferença entre si pelo teste *t* de Student ($P < 0.05$).

Tabela 2. Resultados da média e desvio padrão (S) do diâmetro luteal (DCL), da área da parede do CL (ACL), da área de vascularização da parede do CL (VCL) e do percentual de vascularização do CL (%VCL) de acordo com a expressão do estro de fêmeas bovinas Nelore submetidas a um programa de sincronização.

Grupo experimental	DCL	ACL	VCL	%VCL	P4
	Média ± S (cm)	Média ± S (cm)	Média ± S (cm)	Média ± S (%)	(ng/mL)
SEM ESTRO	1,80 ± 0,28 ^b	2,62 ± 0,69 ^b	0,92 ± 0,33 ^b	36,39 ± 12,48	8,35 ± 6,63 ^b
COM ESTRO	2,00 ± 0,28 ^a	3,37 ± 0,78 ^a	1,31 ± 0,43 ^a	39,42 ± 11,59	12,19 ± 5,55 ^a
TOTAL	1,95 ± 0,25	3,17 ± 0,76	1,23 ± 0,43	38,52 ± 11,38	10,74 ± 5,81

^{a,b}Letras distintas dentro das colunas indicam diferença entre si pelo teste *t* de Student ($P < 0.05$).

Tabela 3. Taxa de concepção de vacas *Bos indicus* que expressaram, ou não, estro em um protocolo de sincronização para IATF.

Grupo experimental	N	Taxa % (N)
SEM ESTRO	27	29,6% (8/27) ^b
COM ESTRO	38	60,5% (23/38) ^a
TOTAL	65	47,7% (31/65)

^{a,b}Letras distintas indicam diferença entre si através do estudo de dispersão de frequências pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) $P = 0,01$.

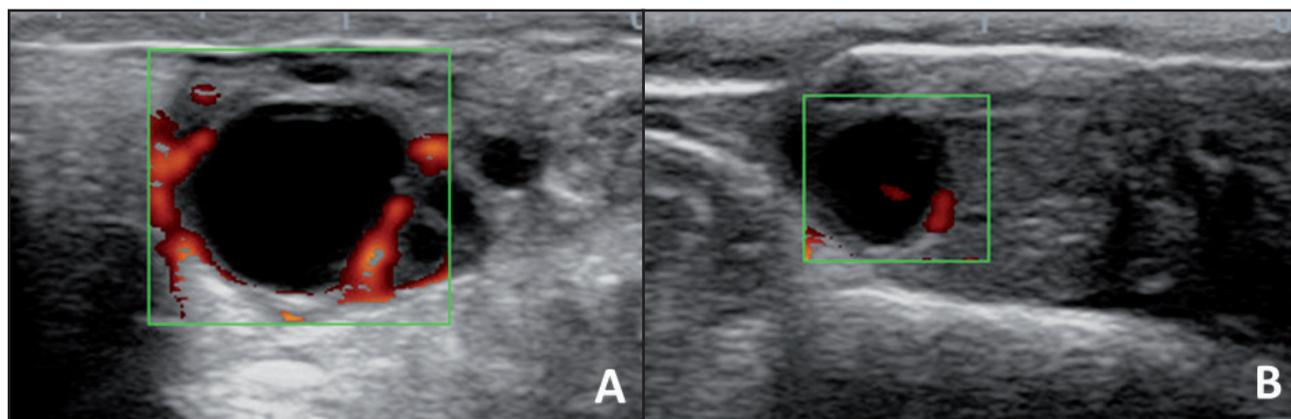


Figura 1. Imagens ultrassonográficas modo B e Doppler colorido de ovário de fêmea bovina. A- Vascularização na parede do folículo pré-ovulatório de fêmea que expressou estro no D11 do protocolo de sincronização. B- Vascularização na parede do folículo pré-ovulatório de fêmea que não expressou estro no D11 do protocolo de IATF.

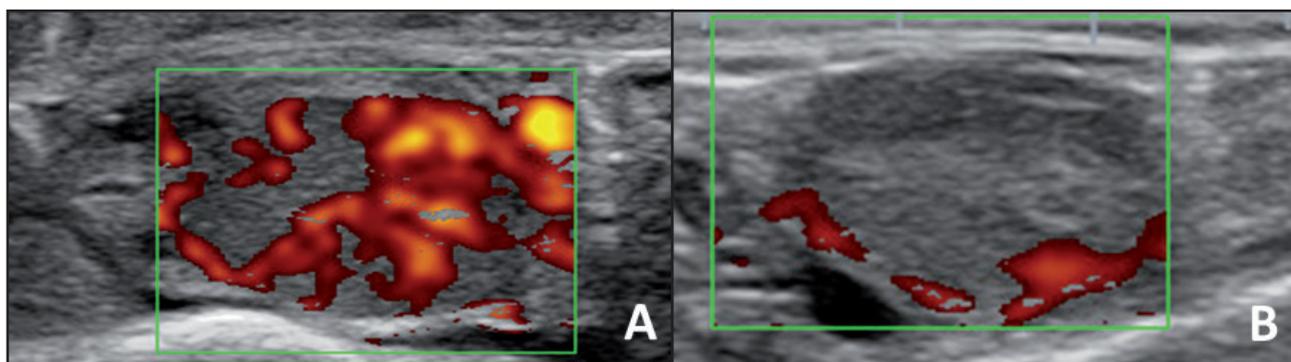


Figura 2. Imagens ultrassonográficas modo B e Doppler colorido de ovário de fêmea bovina. A- Vascularização luteal em fêmea que expressou estro no D11 do protocolo de sincronização. B- Vascularização luteal em fêmea que não expressou estro no D11 do protocolo de IATF.

DISCUSSÃO

No presente estudo houve uma associação entre as dimensões foliculares e a expressão do estro, corroborando aos achados de algumas pesquisas que indicaram uma relação entre o estro antes da IATF e o maior diâmetro do folículo ovulatório [36-38,44,45]. De forma semelhante, Ferraz *et al.* [21] desenvolveram trabalhos com objetivo de avaliar a associação entre a intensidade de expressão do estro de fêmeas bovinas submetidas a IATF e o diâmetro do folículo ovulatório, constatando diferença entre os animais que expressaram estro e os que não expressaram estro, obtendo média de $12,61 \pm 3,34$ mm e $10,30 \pm 2,98$ mm, respectivamente. Em pesquisas similares, Madureira *et al.* [30] averiguaram que fêmeas bovinas com expressão de estro divergiram estatisticamente quanto ao diâmetro do folículo ovulatório em comparação as fêmeas sem expressão de estro, certificando-se, então, que maiores folículos proporcionaram uma maior expressão de estro.

Sá Filho *et al.* [46], em um de seus estudos, apontaram também que a ocorrência do estro está intimamente relacionada com um melhor desempenho ovariano. Estes achados podem ser explicados pelo fato de os autores observarem que as vacas que manifestaram estro entre a retirada do implante de progesterona e o momento da realização da inseminação, possuem elevadas concentração de estradiol circulante, associada a maiores dimensões foliculares [6,20,23,26,27,41]. Neste contexto, o papel do estradiol durante esse período foi plurifacetado, exercendo efeito sobre as células foliculares, as quais se prepararam para ovulação e luteinização; sendo crucial para retomada da meiose oocitária; atuou no transporte espermático por meio de contrações uterinas; ajustou o pH uterino, aumentando a viabilidade espermática; e consequentemente, estes fatores favoreceram o sucesso da fertilização [14,18,31,37,40,42].

O aumento do estradiol tem sido correlacionado também com alterações funcionais nos ovários referente ao maior aporte vascular, sendo fundamental para o suprimento adequado de metabólitos responsáveis pelo crescimento, maturação e ruptura folicular [2-4,39]. Seguindo essa linha de pesquisa, trabalhos com a ultrassonografia modo Doppler colorido, verificaram ainda que o incremento do fluxo sanguíneo folicular estava associado com uma maior produção de estradiol. Ainda nesse contexto,

observou-se uma correlação entre o momento de maior vascularização folicular e o pico de liberação do LH, sugerindo um possível potencial de liberação de fatores endoteliais desse hormônio [32,47]. No entanto, na literatura existe carência de estudos que avaliaram diretamente o efeito da expressão do estro sobre a hemodinâmica folicular, sendo assim o presente estudo surge como precursor em validar esses achados, apontando diferenças significativas e numéricas entre os grupos COM ESTRO e SEM ESTRO para as variáveis VFOL e %VFOL, respectivamente.

Em estudos similares, observou-se a influência do comportamento de estro sobre as dimensões luteais e os níveis séricos de progesterona no período pós-ovulatório, sugerindo, assim, a existência de uma correlação entre expressão do estro e parâmetros morfofuncionais luteais [34,35,43]. Deste modo, a mensuração da vascularização, nesta estrutura ovariana, pode fornecer importantes informações sobre a função luteal e o índice de fertilidade em fêmeas bovinas [8,12,28,48].

O presente experimento comprova que o comportamento de estro pode prever as características morfológicas luteais por meio das diferenças significativas apresentadas entre os grupos COM ESTRO e SEM ESTRO para as variáveis DCL e ACL. Sá Filho *et al.* [46], buscando avaliar a influência do estro sobre o diâmetro luteal de vacas submetidas a IATF, constatou distinções entre as fêmeas que apresentaram estro e as que não demonstraram estro, obtendo média de $22,9 \pm 3,0$ mm e $20,3 \pm 3,9$ mm, respectivamente. De forma similar, Rodrigues *et al.* [43] averiguaram que as fêmeas que apresentavam o comportamento do estro antes do momento da inseminação propriamente dita, também, apresentaram maiores dimensões luteais.

Entretanto, no que se refere a diferença apresentada entre os grupos para a característica VCL, existe uma escassez de relatos na literatura que venham comprovar a relação entre a expressão de estro e a vascularização luteal. Portanto, este estudo pode ser denominado como pioneiro quanto a essa avaliação. Diante desse cenário, trabalhos têm demonstrado que vacas com baixa vascularização luteal, durante o diestro, tendem a apresentar baixas concentrações de progesterona e reduzidas taxas de concepção, visto que, são necessárias

concentrações suficientes de progesterona para a manutenção de condições favoráveis ao desenvolvimento embrionário e estabelecimento da gestação [24,25]. Em um estudo de revisão sobre o uso da ultrassonografia modo Doppler para avaliação da dinâmica ovariana de fêmeas bovinas, foi identificada uma maior vascularização luteal nos animais com maior produção de progesterona e melhores índices de concepção [10].

No presente experimento, o comportamento de estro afetou, também, as concentrações séricas de progesterona. Da mesma forma, trabalhos avaliando a relação entre a expressão do estro e os parâmetros luteais em fêmeas de corte submetidas a um programa de IATF, observaram maiores níveis séricos de progesterona para os animais que demonstraram estro antes do momento da inseminação [13,20]. Murdoch e Van Kirk [33] apontaram uma correlação entre maiores concentrações de estradiol e uma maior proliferação das células da granulosa que após a ovulação se tornaram as grandes células luteais, sendo estas responsáveis por 80% da produção de progesterona. Uma avaliação ovariana por meio da ultrassonografia modo Doppler, comprovou a relação entre parâmetros funcionais foliculares e luteais [1]. Assim, o comprometimento dos parâmetros morfológicos e funcionais foliculares poderão desencadear a formação de corpos lúteos com característica semelhante e consequentemente apresentarem menor produção de P4, afetando os índices de concepção.

Desta forma, alguns dos efeitos da expressão do estro são manifestados durante período peri-ovulatório, enquanto outros são exibidos durante a fase lútea. A junção destas ações, possivelmente, cria um ambiente endócrino favorável à concepção [11,29]. Estudos sobre o impacto da expressão do estro sobre a fertilidade de bovinos de leite, evidenciaram melhores índices de concepção para o grupo com estro em relação aos animais que não apresentaram estro [13]. Em pesquisa com fêmeas de corte submetidas a um protocolo de IATF, foram observados maiores índices de prenhez no grupo de animais que esboçaram estro antes do momento da inseminação artificial propriamente dita [15]. Certificando, assim, que expressão do estro constitui uma ferramenta que pode ser utilizada para direcionar acasalamentos em programas de sincronização.

Os achados supracitados podem ser justificados por meio de diversos experimentos os quais comprovaram que a soma dos efeitos da expressão do estro promoveu condições ideais para o reconhecimento materno da gestação. Segundo tais pesquisadores, fêmeas que demonstraram estro antes do momento inseminação, apresentaram um incremento no alongamento embrionário devido a elevada expressão de genes para RNAm que estão relacionados a síntese do interferon e da prostaglandina E, os quais constituem os principais fatores responsáveis pela sinalização da gestação para os tecidos maternos [11,17,22]. Confirmando esses achados, Larimore *et al.* [27] buscando avaliar a influência da expressão do estro sobre a qualidade dos embriões de fêmeas de corte, verificaram também uma maior qualidade nos embriões do grupo que apresentou o comportamento de estro, justificando, assim, os altos índices fertilidade esboçados pelos animais que expressão estro em programas de sincronização.

CONCLUSÕES

O comportamento de estro impactou os parâmetros morfofuncionais foliculares e luteais, e consequentemente afetou a fertilidade de fêmeas submetidas ao programa de IATF. Desta forma, a detecção do estro pode ser usada como ferramenta para direcionar acasalamentos em protocolos de sincronização, promovendo identificação dos animais com maior probabilidade de concepção por apresentar melhores condições hemodinâmicas foliculares e luteais.

MANUFACTURERS

¹SonoScape. Shenzhen, China.

²Zoetis Inc. Parsippany-Troy Hills, NJ, USA.

³Ouro Fino Agroindustrial Ltda. Cravinhos, SP, Brazil.

⁴Walmur Instrumentos Veterinários. Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵Becton, Dickinson and Company. Franklin Lakes, NJ, USA.

⁶Beckman Coulter. Fullerton, CA, USA

⁷SPSS Inc. Chicago, IL, USA.

Ethical approval. The study was approved by the Animal Local Ethics Committee (CEUA) of the Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), BA, Brazil, under protocol number 002/2018].

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

REFERENCES

- 1 **Abdelnaby E.A., El-Maaty A.M.A., Ragab R.S. & Seida A.A. 2018.** Dynamics of uterine and ovarian arteries flow velocity waveforms and their relation to follicular and luteal growth and blood flow vascularization during the estrous cycle in Friesian cows. *Theriogenology*. 121: 112-121.
- 2 **Acosta T.J., Ozawa T., Kobayashi S., Hayashi K., Ohtani M., Kraetzl W.D. & Miyamoto A. 2002.** Periovarian changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin F_{2α}, and steroid hormones from bovine mature follicles *in vivo*. *Biology of Reproduction*. 63(5): 1253-1261.
- 3 **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(5): 759-767.
- 4 **Acosta T.J. & Miyamoto A. 2004.** Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science*. 82-83: 127-140.
- 5 **Aslan S., Arslanbas D., Beindorff N. & Bollwein H. 2011.** Effects of induction of ovulation with GnRH or hCG on follicular and luteal blood flow in Holstein–Friesian heifers. *Reproduction in Domestic Animals*. 46(5): 781-786.
- 6 **Atkins J.A., Smith M.F., Wells K.J. & Geary T.W. 2010.** Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate after gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part I: Cycling cows. *Journal of Animal Science*. 88(7): 2300-2310.
- 7 **Baruselli P.S., Catuzzi B.L.C., Abreu L.A., Elliff F.M., Silva L.G., Batista E.S. & Crepaldi G.A. 2019.** Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 43(2): 308-314.
- 8 **Beindorff N., Nagai K., Shirasuna K., Herzog K., Hoeffmann K., Sasak M., Bollwein H. & Miyamoto A. 2010.** Vascular Changes in the Corpus Luteum During Early Pregnancy in the Cow. *Journal of Reproduction and Development*. 56(2): 263-270.
- 9 **Bó G.A., Huguenine E., Mata J.J.L., Núñez-Olivera R., Baruselli P.S. & Menchaca A. 2018.** Programs for fixed-time artificial insemination in South American beef cattle. *Animal Reproduction*. 15(Suppl 1): 952-962.
- 10 **Bollwein H., Heppelmann M. & Lüttgenau J. 2016.** Ultrasonographic Doppler use for female reproduction management. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*. 32(1): 149-164.
- 11 **Bridges G.A., Mussard M.L., Pate J.L., Ott T.L., Hansen T.R. & Day M.L. 2012.** Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. *Animal Reproduction Science*. 133(1-2): 16-26.
- 12 **Counce S.L., Dadarwal D., Adams G.P., Brar P. & Singh J. 2019.** An objective volumetric method for assessment of ovarian follicular and luteal vascular flow using colour Doppler ultrasonography. *Theriogenology*. 138: 66-76.
- 13 **Cavalieri J., Gaina C. & Hepworth G. 2018.** Randomised controlled trial of the effect of concentration of progesterone before artificial insemination on fertility in ovulatory and anovulatory *Bos indicus* cattle. *Australian Veterinary Journal*. 96(9): 346-355.
- 14 **Colazo M.G., Behrouzi A., Ambrose D.J. & Mapletoft R.J. 2015.** Diameter of the ovulatory follicle at timed artificial insemination as a predictor of pregnancy status in lactating dairy cows subjected to GnRH-based protocols. *Theriogenology*. 84(3): 377-383.
- 15 **Colazo M.G., Whittaker P., Macmillan K., Bignell D., Boender G., De Carvalho Guimaraes R. & Mapletoft R.J. 2018.** Evaluation of a modified GnRH-based timed-AI protocol associated with estrus detection in beef heifers inseminated with sex-selected or conventional semen. *Theriogenology*. 118: 90-95.
- 16 **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2013.** *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 104p.
- 17 **Cooke R.F., Pohler K.G., Vasconcelos J.L.M. & Cerri R.L.A. 2019.** Estrous expression during a fixed-time artificial insemination protocol enhances development and interferon-tau messenger RNA expression in conceptuses from *Bos indicus* beef cows. *Animal*. 13(11): 2569-2575.
- 18 **Dantas F.G., Zechiel K.E., Reese S.T., Araújo G., Rhinehart J.D. & Pohler K.G. 2016.** Keys to maximizing reproductive efficiency in a beef herd. Disponível em: <[https:// www.conapecjr.com.br](https://www.conapecjr.com.br)>.
- 19 **De Tarso S.G.S., Gastal G.D.A., Bashir S.T., Gastal M.O., Apgar G.A. & Gastal E.L. 2017.** Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. *Reproduction, Fertility and Development*. 29(3): 448-457.
- 20 **Edwards S.A.A., Bo G.A., Chandra K.A., Atkinson P.C. & McGowan M.R. 2015.** Comparison of the pregnancy rates and costs per calf born after fixed-time artificial insemination or artificial insemination after estrus detection in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*. 83(1): 114-120.

- 21 Ferraz P.A., Loiola M.V.G., Rodrigues A.S., Lima M.C.C., Bittencourt T.C.B.S.C. & Ribeiro Filho A.L. 2017. The effect of the intensity of estrus expression on the follicular diameter and fertility of nellore cows managed under a FTAI program. *Ciência Animal Brasileira*. 18: 1-9.
- 22 Forde N., Mcgettigan P.A., Mehta J.P., O'hara L., Mamo S., Bazer F.W. & Lonergan P. 2014. Proteomic analysis of uterine fluid during the pre-implantation period of pregnancy in cattle. *Reproduction*. 147(5): 575-587.
- 23 Gentry Jr G.T., Walker R.S. & Gentry L.R. 2016. Impacts of incorporation of follicle stimulating hormone into an estrous synchronization protocol for timed artificial insemination of crossbred beef cattle. *Animal Reproduction Science*. 168: 19-25.
- 24 Hassan M., Arshad U., Bilal M., Sattar A., Avais M., Bollwein H. & Ahmad N. 2018. Luteal blood flow measured by Doppler ultrasonography during the first three weeks after artificial insemination in pregnant and non-pregnant *Bos indicus* dairy cows. *Journal of Reproduction and Development*. 65(1): 29-36.
- 25 Herzog K., Brockhan-Lüdemann M., Kaske M., Beindorff N., Paul V., Niemann H. & Bollwein H. 2010. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology*. 73(5): 691-697.
- 26 Kasimanickam R.K., Kasimanickam V.R., Oldham J. & Whitmore M. 2020. Cyclicity, estrus expression and pregnancy rates in beef heifers with different reproductive tract scores following progesterone supplementation. *Theriogenology*. 145: 39-47.
- 27 Larimore E.L., Amundson O.L., Bridges G.A., Mcneel A.K., Cushman R.A. & Perry G.A. 2016. Changes in ovarian function associated with circulating concentrations of estradiol before a GnRH-induced ovulation in beef cows. *Domestic Animal Endocrinology*. 57: 71-79.
- 28 Lüttgenau J., Beindorff N., Ulbrich S.E., Kastelic J.P. & Bollwein H. 2011. Low plasma progesterone concentrations are accompanied by reduced luteal blood flow and increased size of the dominant follicle in dairy cows. *Theriogenology*. 76(1): 12-22.
- 29 Madsen C.A., Perry G.A., Mogck C.L., Daly R.F., Macneil M.D. & Geary T.W. 2015. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. *Animal Reproduction Science*. 158: 96-103.
- 30 Madureira A.M.L., Silper B.F., Burnett T.A., Polsky L., Cruppe L.H., Veira D.M. & Cerri R.L.A. 2015. Factors affecting expression of estrus measured by activity monitors and conception risk of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 98(10): 7003-7014.
- 31 Madureira A.M.L., Polsky L.B., Burnett T.A., Silper B.F., Soriano S., Sica A.F. & Cerri R.L.A. 2019. Intensity of estrus following an estradiol-progesterone-based ovulation synchronization protocol influences fertility outcomes. *Journal of Dairy Science*. 102(4): 3598-3608.
- 32 Miyamoto A., Shirasuna K., Hayashi K.G., Kamada D., Awashima C., Kaneko E., Acosta T.J. & Matsui M.A. 2006. 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*. 52(1): 153-160.
- 33 Murdoch W.J. & Van Kirk E.A. 1998. Luteal dysfunction in ewes induced to ovulate early in the follicular phase. *Endocrinology*. 139: 3480-3484.
- 34 Nogueira E., Silva M.R., Silva J.C.B., Abreu U.P.G., Anache N.A., Silva K.C., Cardoso C.J.T., Sutovsky P. & Rodrigues W.B. 2019. Timed artificial insemination plus heat I: effect of estrus expression scores on pregnancy of cows subjected to progesterone-estradiol-based protocols. *Animal*. 13(10): 2305-2312.
- 35 Pereira M.H.C., Wiltbank M.C. & Vasconcelos J.L.M. 2016. Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. *Journal Dairy Science*. 99(3): 2237-2247.
- 36 Perry G.A., Smith M.F., Roberts A.J., Macneil M.D. & Greary T.W. 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *Journal Animal Science*. 85: 684-689.
- 37 Perry G.A., Swanson O.L., Larimore E.L., Perry B.L., Djira G.D. & Cushman R.A. 2014. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domestic Animal Endocrinology*. 48: 15-20.
- 38 Pfeifer L.F.M., Moreira E.M., Silva G.M., Souza V.L., Nunes V.R.R., Andrade J.S., Neves P.M.A. & Ferreira R. 2020. Effect of estradiol cypionate on estrus expression and pregnancy in timed artificially inseminated beef cows. *Livestock Science*. 231: 1-5.

- 39 Pinaffi F.L., Santos É.S., Silva M.G.D., Maturana Filho M., Madureira E.H. & Silva L.A. 2015.** Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at the time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 35(5): 470-476.
- 40 Pohler K.G., Geary T.W., Atkins J.A., Perry G.A., Jinks E.M. & Smith M. F. 2012.** Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. *Cell and Tissue Research*. 349(3): 649-664.
- 41 Ribeiro Filho A.D.L., Ferraz P.A., Rodrigues A.S., Bittencourt T.C.B.S.C., Loiola M.V.G. & Chalhoub M. 2013.** Diâmetro do foliculo no momento da inseminação artificial em tempo fixo e taxa de concepção em vacas Nelore. *Ciência Animal Brasileira*. 14(4): 501-507.
- 42 Richardson B.N., Hill S.L., Stevenson J.S., Djira G.D. & Perry G.A. 2016.** Expression of estrus before fixed-time AI affects conception rates and factors that impact expression of estrus and the repeatability of expression of estrus in sequential breeding seasons. *Animal Reproduction Science*. 166: 133-140.
- 43 Rodrigues A.D., Cooke R.F., Cipriano R.S., Silva L.G.T., Cerri R.L.A., Cruppe L.H., Meneghetti M., Pohler K.G. & Vasconcelos J.L.M. 2018.** Impacts of estrus expression and intensity during a timed-AI protocol on variables associated with fertility and pregnancy success in *Bos indicus*-influenced beef cows. *Journal Animal Science*. 96(1): 236-249.
- 44 Sá Filho M.F., Torres-Júnior J.R.S., Penteado L., Gimenes L.U., Ferreira R.M., Ayres H., Castro e Paula L.A., Sales J.N.S. & Baruselli P.S. 2010.** Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Animal Reproduction Science*. 118: 182-187.
- 45 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.
- 46 Sá Filho M.F. 2012.** Importância da ocorrência de estro e do diâmetro folicular no momento da inseminação em protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas zebuínas de corte. 124f. São Paulo, SP. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- 47 Siddiqui M.A.R., Almamun M. & Ginther O.J. 2009.** Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. *Animal Reproduction Science*. 113(1-4): 287-292.
- 48 Silva M.A.A., Rodrigues A.S., Brandão T.O., Maggitti Junior L.D.P., Carôso B.S.S., Chalhoub M., Bittencourt R.F. & Ribeiro Filho A.L. 2018.** Avaliação morfofuncional do corpo lúteo para diagnóstico precoce de gestação 20 dias após IATF em vacas mestiças leiteiras. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 38(10): 2006-2011.
- 49 Thomas J.M., Poock S.E., Eilersieck M.R., Smith M.F. & Patterson D.J. 2014.** Delayed insemination of non-estrous heifers and cows when using conventional semen in timed artificial insemination. *Journal Animal Science*. 92(9): 4189-4197.
- 50 Wright I.A., Russel A.J.F. & Hunter E.A. 1986.** The use of body condition scoring to ration beef cows in late pregnancy. *Animal Science*. 43(3): 391-396.