

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Abordagens para reverter casos de infertilidade em vacas leiteiras:
Inseminação artificial intrafolicular e exposição prolongada a estrógenos**

Sergio Farias Vargas Júnior

Pelotas, 2019

Sergio Farias Vargas Júnior

**Abordagens para reverter casos de infertilidade em vacas leiteiras:
Inseminação artificial intrafolicular e exposição prolongada a estrógenos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Thomaz Lucia Jr., PhD

Coorientador: Bernardo Garziera Gasperin, D.C.

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

J11a Vargas Júnior, Sergio Farias

Abordagens para reverter casos de infertilidade em vacas leiteiras: Inseminação artificial intrafolicular e exposição prolongada a estrógenos / Sergio Farias Vargas Júnior ; Thomaz Lucia Jr, orientador ; Bernardo Garziera Gasperin, coorientador. — Pelotas, 2019.

69 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Fertilidade. 2. Bovinos leiteiros. 3. Indução artificial da lactação. 4. Espermatozoide. 5. Perfil endócrino. I. Lucia Jr, Thomaz, orient. II. Gasperin, Bernardo Garziera, coorient. III. Título.

CDD : 636.234

Sergio Farias Vargas Júnior

Abordagens para reverter casos de infertilidade em vacas leiteiras: Inseminação artificial intrafolicular e exposição prolongada a estrógenos

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 11/02/2019

Banca examinadora:

Prof. Thomaz Lucia Jr., PhD. (Orientador)
Doutor em Medicina Veterinária pela University of Minnesota

Prof. Dr. Eduardo Schmitt
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Monique Tomazele Rovani
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Dr^a. Jorgea Pradieé
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradeço a Deus a vida que tenho!

Agradeço a Família. Agradeço meus pais, Sergio e Flávia, pela educação, pelo apoio incondicional e pelo exemplo de caráter e honestidade que são. Agradeço as minhas irmãs, Mariana, pela paciência e pela ajuda na elaboração deste documento e Carolina, pelo exemplo de força e maneira como encara as dificuldades. Não menos importante, minha namorada Viviane, pelo companheirismo e paciência nesta etapa da minha vida.

Ao grupo ReproPel, principalmente ao meu orientador Thomaz Lucia Jr. Pelas orientações e pela disponibilidade em me orientar ao longo deste período. Aos professores e amigos Bernardo Gasperin, Rafael Mondadori e Arnaldo Vieira agradeço os ensinamentos e o companheirismo nesta jornada.

A equipe do BioRep pela disponibilidade de realização de parte deste trabalho e pelos trabalhos em conjunto.

A EMBRAPA pela disponibilidade dos animais para realização de etapas deste trabalho e pelos trabalhos realizados ao longo do doutorado.

Ao centro agropecuário da palma pela disponibilidade dos animais para realização dos experimentos e pela disponibilidade em ceder animais para realização de atividades práticas para aprimoramento de biotecnias reprodutivas.

Aos órgãos de fomento, FAPERGS e CNPq pelo financiamento das pesquisas, e à CAPES, pela bolsa de estudo e apoio financeiro.

Aos amigos sempre presentes nos momentos de felicidade, nunca deixando de apoiar nos momentos difíceis.

A todos que de uma forma ou outra fizeram com que eu pudesse alcançar este objetivo ao longo destes anos, o meu muito obrigado!

Resumo

VARGAS-JÚNIOR, Sergio Farias. **Abordagens para reverter casos de infertilidade em vacas leiteiras: Inseminação artificial intrafolicular e exposição prolongada a estrógenos.** 2019. 69f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Problemas de infertilidade são comuns em vacas leiteiras, principalmente naquelas com alta produtividade, que possuem um metabolismo acelerado metabolizam mais rapidamente hormônios esteroides, como estradiol (E2) e progesterona (P4). Técnicas como a inseminação artificial intrafolicular (IAIF) e a prolongada exposição a estrógenos em protocolos de indução artificial da lactação (IAL) tem demonstrado resultados promissores como alternativas para reverter estes quadros. No primeiro estudo, objetivou-se avaliar a motilidade de espermatozoides após inseminação artificial intrafolicular (IAIF) *in vivo* ou após incubação em fluido folicular, *in vitro*. A recuperação do conteúdo folicular foi realizada 1 a 4 h após a IAIF, para avaliação da motilidade espermática *in vivo*. Posteriormente, os espermatozoides de um pool de doses comerciais foram avaliados quanto à sua cinética após incubação *in vitro*, puros (em *pool*) ou em fluido folicular (FF), por até 3 h. A motilidade dos espermatozoides foi reduzida, tanto *in vitro* como *in vivo*, permitindo concluir que o folículo ovariano e o FF não proporcionam um ambiente adequado para a manutenção da motilidade dos espermatozoides bovinos. O segundo estudo, teve como objetivo determinar os níveis séricos de E2 e P4 em vacas submetidas a longos períodos de exposição ao estrógeno, bem como identificar as alterações no perfil gênico e celular do endométrio das vacas expostas a IAL. As vacas apresentavam $51,4 \pm 11,0$ pg/ml de estradiol no dia (D) 0, mas apresentaram níveis maiores nos dias 2, 4, 8, 10 e 13 após o tratamento ($P < 0,05$), atingindo até 4.000 pg/ml no D4. Os níveis de P4 foram superiores a 6 ng/ml no D0 e, durante o período de aplicação hormonal, as vacas induzidas mantiveram níveis acima de 6 ng/ml, retornando aos níveis basais no D8. Após o tratamento, o receptor *OXTR* (ocitocina) apresentou menor expressão ($P < 0,05$), enquanto o receptor *PGR* (progesterona) e o gene *SERPINA14* apresentaram um leve aumento na expressão ($P < 0,07$). A modulação gênica exercida nos receptores de *OXTR*, *PRG* e no gene de *SERPINA14* sugerem que a prolongada exposição a estrógenos influencia o ambiente uterino de vacas submetidas a protocolos de IAL, com efeitos positivos sobre sua fertilidade subsequente. A prolongada exposição a estrógenos não foi capaz de induzir modificações no padrão celular e na resposta imune no endométrio de vacas no proestro depois do tratamento. O presente estudo fornece informações a respeito da utilização de IAIF em bovinos para que futuros estudos sejam realizados. Ainda, fornece dados referentes ao perfil endócrino de vacas expostas a prolongada exposição a estrógenos, bem como as alterações promovidas por esta exposição na expressão gênica do endométrio e no seu perfil celular.

Palavras-chave: fertilidade; bovinos leiteiros; indução artificial da lactação; espermatozoide; perfil endócrino.

Abstract

VARGAS-JUNIOR, Sergio Farias. **Approaches to reverse infertility in dairy cows: intrafollicular artificial insemination and prolonged estrogen exposure.** 2019. 69f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Infertility problems are common in dairy cows, especially on high-yielding cows, who have accelerated metabolism of steroid hormones, such as estradiol (E2) and progesterone (P4). Techniques such as intrafollicular artificial insemination (IFAI) and prolonged exposure to estrogens in artificial lactation induction (ALI) protocols have shown promising results as alternatives to reverse previous infertility. In a first study, the objective was to evaluate sperm motility *in vivo* after IFAI or after incubation in follicular fluid *in vitro*. Aspiration to recover follicular content was conducted 1 to 4 h after IFAI to evaluate sperm motility. Thereafter, kinetics of pooled spermatozoa from commercial frozen-thawed semen doses were evaluated after incubation in follicular fluid (FF) or pure (control) for 1 to 3 h. Reduced sperm motility was observed both *in vitro* and *in vivo*, leading to the conclusion that both ovarian follicles and FF do not provide an adequate environment to maintain bull sperm motility. The second study had the objective to determine the serum levels of E2 and P4 in cows submitted to long periods of estrogen exposure and to identify changes in the gene and cell profile of the endometrium of cows exposed to ALI. Cows presented $51.4 \pm 11,0$ pg/ml of E2 at the D0, but achieved greater levels at days 2, 4, 8, 10 and 13 ($P < 0.05$), reaching up to 4,000 pg/ml at D4. Levels of P4 were greater than 6 ng/ml at D0 and during the entire treatment period, returning to basal levels at D8. After treatment, the *OXTR* receptor (oxytocin) presented lower expression ($P < 0.05$), whereas the *PGR* (progesterone) receptor and the *SERPINA14* gene presented a slightly increased expression ($P < 0.07$). The gene modulation of the *OXTR*, *PRG* and *SERPINA14* receptors suggests that prolonged estrogen exposure influences the uterine environment of cows submitted to ALI, with positive effects on their subsequent fertility. Prolonged estrogen exposure was not able to induce modifications in the cell pattern and immune response in the endometrium of cows in proestrus after treatment. The present study provides information on the use of IFAI in cattle for future studies. Furthermore, it provides data regarding the endocrine profile of cows exposed to prolonged exposure to estrogens, as well as the changes promoted by this exposure in the gene expression of the endometrium and its cellular profile.

Keywords: fertility; dairy cattle; artificial induction of lactation; sperm; endocrine profile.

Lista de Figuras

Artigo 2

- Figura 1 Desenho experimental do experimento 1. Protocolo de pré-sincronização (D-17 a D-6) e coleta de amostras de endométrio de vacas no proestro (D-6) antes da exposição a estrógenos; Protocolo de indução da lactação (D0 a D21); Protocolo de nova sincronização (D55 a D66) para coleta de amostras de endométrio no proestro (D66) pós-exposição ao protocolo de indução..... 52
- Figura 2 Desenho experimental do experimento 2 conforme os tratamentos de sais de estradiol e progesterona..... 53
- Figura 3 Padrão celular encontrado na citologia uterina. Células superficiais (TI), células intermediárias (TII), células basais (TIII), neutrófilos (N), linfócitos (L) e eritrócitos (E)..... 53
- Figura 4 Porcentagem de células avaliadas no esfregaço feito a partir da citologia uterina nas vacas antes (D-6) e após tratamento (D66). Nos dois momentos as células foram coletadas no proestro. Células superficiais (TI), células intermediárias (TII), células basais (TIII), neutrófilos (N) e linfócitos (L) ($p < 0,05$)..... 54
- Figura 5 Abundância relativa de RNAm das células endometriais coletadas por biopsia de vacas no proestro antes e depois da exposição aos estrógenos ($p < 0,05$)..... 55

Figura 6	Abundância relativa de RNAm das células endometriais coletadas por biopsia de vacas no proestro antes e depois da exposição aos estrógenos.....	55
Figura 7	Níveis de estrógeno (A) e progesterona (B) em vacas submetidas a indução artificial da lactação.....	56
Figura 8	Níveis de Estrógeno das vacas do experimento II.....	56

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Sperm kinetics parameters after <i>in vitro</i> incubation at 37 °C for 1 or 3h in their own extender (pool; control group) or in bovine follicular fluid (1).....	32
----------	--	----

Artigo 2

Tabela 1	Genes e sequências de iniciadores.....	51
Tabela 2	Número de células avaliadas por citologia endometrial antes e depois da exposição a estrógenos (média ± erro padrão).....	51

Lista de Abreviaturas e Siglas

AIL	Artificial induction of lactation
ALH	Amplitude of Lateral Head Displacement
BCF	Beat Cross Frequency
BE	Benzoato de estradiol
bST	Somatotropina bovina
bSTr	Somatotropina bovina recombinante
CASA	Computer-assisted sperm analysis
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CL	Corpo Lúteo
DCL	Curvilinear distance
E	Eritrócitos
E2	Estradiol
ECP	Cipionato de estradiol
EGF	Fator de crescimento epidermal
ESR2	Receptores para E2
FF	Fluído folicular
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
GIFT	Transferência do gameta masculino e feminino diretamente na tuba uterina
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
IAIF	Inseminação intrafolicular
IAIU	Inseminação intra-uterina
IAL	Indução artificial da lactação
IFAI	Intrafollicular insemination technique
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IgG e IgF	Imunoglobulinas
IVD	Intravaginal device
IVF	<i>In vitro</i> fertilization

L Linfócitos
LIN Linearity
N Neutrófilos
OT Ocitocina
OXTR Receptor de Ocitocina
P4 Progesterona
PGF Prostaglandina
PGR Receptor de P4
PhD Doutor da Filosofia
PM Progressive motility
Prof Professor
Profa Professora
RS Rio Grande do Sul
STR Straightness
TI Células superficiais
TII Células intermediárias
TIII Células basais
TM Total motility
UFPeI Universidade Federal de Pelotas
VAP Average path velocity
VCL Curvilinear velocity
VSL Straight-line Velocity
WOB Wobble

Sumário

1 Introdução.....	14
2 Revisão da Literatura.....	16
2.1 Inseminação artificial intrafolicular (IAIF).....	16
2.2 Associação entre os níveis de estrógeno e diâmetro folicular.....	19
2.3 Ação dos hormônios esteroides sobre o desenvolvimento embrionário e o ambiente uterino.....	20
2.4 Perfil endócrino e imunidade do trato reprodutivo.....	21
2.5 Exposição prolongada a esteroides em protocolos de Indução Artificial da Lactação (IAL).....	21
3 Artigos.....	23
3.1 Artigo 1.....	23
3.2 Artigo 2.....	33
4 Considerações Finais.....	57
Referências.....	58
Anexos.....	66

1 Introdução

Com o aumento acelerado da população mundial, a crescente procura por alimentos de origem animal, especialmente de bovinos, torna imprescindível o incremento da produtividade da bovinocultura para atender esta demanda. Apesar de possuir o maior rebanho comercial do mundo (COOK, 2016), o Brasil ainda possui baixos índices produtivos, especialmente em termos de eficiência reprodutiva, que é bastante impactada pela infertilidade das fêmeas.

Diversos estudos sugerem possibilidades para as principais causas relacionadas aos problemas de infertilidade nas fêmeas bovinas. O estresse térmico (DE RENSIS et al., 2017), o diâmetro do folículo pré ovulatório (PERRY et al., 2007), baixos níveis de progesterona nas fases iniciais de gestação (Forde et al., 2011), níveis pré-ovulatórios inadequados de estradiol (MADSEN et al., 2015) e falhas na ovulação (SARTORI et al., 2001) são exemplos de fatores que influenciam diretamente na capacidade da vaca de conceber um bezerro por ano.

Rebanhos voltados à produção de leite apresentam problemas recorrentes de infertilidade. Vacas leiteiras apresentam o metabolismo acelerado, fazendo com que os hormônios esteroides sejam mais rapidamente metabolizados (SANGSRITAVONG et al., 2002), o que possivelmente explica o motivo pelo qual bovinos de leite apresentam mais problemas de fertilidade (revisado por BERRY et al. (2014)).

Alternativas para reverter problemas de infertilidades na fêmea bovina têm sido testadas com resultados variados. A utilização da inseminação artificial intrafolicular (IAIF), que consiste em depositar o sêmen diretamente no folículo pré ovulatório, foi testada com resultados promissores em vacas com problemas de infertilidade causados pelo estresse térmico (LÓPEZ-GATIUS e HUNTER, 2011). Também, a exposição prolongada a estrógenos, como ocorrem em vacas submetidas a protocolos de indução artificial da lactação (IAL) vem demonstrando resultados positivos com relação ao retorno à fertilidade pós-exposição (FREITAS et al., 2010; MELLADO et al., 2011). Entretanto, existem poucos estudos relacionados à IAIF que possibilitem a comprovação da técnica como uma alternativa viável e

eficiente para retomada da fertilidade em bovinos. Também, não há estudos evidenciando os mecanismos pelos quais vacas submetidas à prolongada exposição a estrógenos retomam a fertilidade. Portanto, existe a necessidade de aprofundar o conhecimentos a respeito dos mecanismos fisiológicos que fazem com que uma vaca não conceba um bezerro por ano, principalmente em relação aos eventos endócrinos, ovarianos e uterinos que propiciam a gestação.

Assim, este trabalho tem por objetivos:

Objetivo geral

- Avaliar o uso de estrógeno em vacas com problemas reprodutivos e o uso da IAIF como alternativas para melhorar à infertilidade.

Objetivos específicos

- Avançar no entendimento dos efeitos do ambiente folicular e fluido folicular sobre a célula espermática através da incubação de espermatozoides *in vitro* e *in vivo*.

- Determinar os níveis séricos de progesterona, estradiol e cortisol durante o proestro/estro e o diestro de vacas antes e após o tratamento com estrógeno;

- Avaliar o efeito da exposição ao estrógeno sobre a resposta inflamatória uterina;

- Avaliar a expressão de genes e as rotas de sinalização relacionados à fertilidade no útero de vacas submetidas a longos períodos de exposição ao estrógeno

2 Revisão da Literatura

2.1 Inseminação artificial intrafolicular (IAIF)

A inseminação artificial intrafolicular (IAIF) é uma técnica desenvolvida e utilizada em humanos com problemas de infertilidade, que consiste na deposição de sêmen diretamente no interior de folículos pré-ovulatórios através da injeção intrafolicular guiada por ultrassonografia (LUCENA et al., 1991; ZBELLA et al., 1992). A IAIF é uma alternativa às técnicas de reprodução assistida já usualmente utilizadas, como a inseminação intrauterina (IAIU), inseminação intraperitoneal, transferência do gameta masculino e feminino diretamente na tuba uterina (GIFT) e fertilização *in vitro* (FIV), que são técnicas caras e trabalhosas, enquanto a IAIF tem menor custo e tem realização relativamente mais simples.

A primeira descrição da técnica de IAIF foi feita por LUCENA et al. (1991) relatando 14 casos em humanos, com quatro gestações concebidas. Em seguida, ZBELLA et al. (1992) descreveram um caso de gestação após longo período de tentativas de IAIU e FIV com gametas de um casal com problema de infertilidade de origem masculina. NUOJUA-HUTTUNEN et al. (1995) também relataram a tentativa de tratamento com a IAIF em 50 pacientes que aguardavam pela FIV.

Em animais os estudos foram primeiramente descritos em equinos, principalmente para contornar anormalidades adquiridas no útero como endometrites, potencializar o uso de doses de sêmen com menor concentração ou o uso de sêmen congelado. MEINJTES et al. (2001) relataram a primeira tentativa de IAIF com o objetivo de realizar a técnica em equinos e avaliar a sua eficácia em estabelecer a gestação. Neste estudo foram inseminadas dez éguas, mas nenhuma gestação foi concebida. Também trabalhando com éguas, Eilts et al. (2002) avaliaram se a IAIF seria prejudicial para o estabelecimento da gestação após a realização de IAIU. Nove éguas receberam 2.500 UI de hCG no momento da IAIU e foram submetidas à IAIF em até 34h depois. Neste trabalho foi relatada uma gestação, porém esta não pode ser associada à IAIF, pois a égua que concebeu teve ovulação dupla e apenas um folículo foi inseminado.

Tentando entender o motivo dos insucessos da técnica em equinos, PARLEVLIE et al. (2005) conduziram um estudo em que dez éguas cíclicas foram utilizadas para IAIF, com o objetivo de recuperação dos espermatozoides quatro horas após, para avaliação de sua viabilidade. Neste trabalho, as fêmeas que manifestaram estro (folículos maiores que 35 mm) receberam 2500UI de hCG e foram inseminadas com diferentes concentrações de espermatozoides: cinco éguas foram inseminadas com 50×10^6 espermatozoides; e cinco com 500×10^6 espermatozoides. Foram observados poucos espermatozoides móveis em sete das 10 amostras. Porém, após avaliação da integridade da membrana, cinco amostras apresentavam espermatozoides com membranas intactas. A porcentagem de recuperação de espermatozoides foi de 0,53% e 9,02% nas fêmeas inseminadas com 50 e 500×10^6 espermatozoides, respectivamente, sendo que todos os espermatozoides recuperados apresentavam reação acrossômica ou estavam em processo de reação. Leão et al. (2005) também avaliaram as causas da ineficiência da técnica, em três experimentos. No primeiro, foram feitas IAIF em 20 éguas, em momento próximo das ovulações sincronizadas com hCG, com 20×10^6 espermatozoides. No segundo, as IAIF foram feitas juntamente com IA convencional, conforme descrito por Eilts et al. (2002), em 10 éguas. No terceiro, foi feito um experimento *in vitro* com sêmen descongelado, sem diluição ou diluído 1:1 em fluido folicular, para avaliar a sobrevivência dos espermatozoides. Não houve nenhuma gestação confirmada no primeiro experimento. No segundo, cinco das dez éguas tiveram prenhez confirmada, após a realização conjunta de IA convencional e IAIF. No terceiro, somente foi observada diferença entre os grupos com e sem fluido folicular no momento inicial (0 h) de avaliações, em que foi observada maior motilidade espermática no grupo sem fluido, porém, não foram observadas diferenças 1, 2 e 3 h após a incubação entre os grupos.

Devido a relatos anteriores de baixa taxa de recuperação espermática após IAIF (PARLEVLIE et al., 2005), Eilts et al. (2006) avaliaram se isto ocorreria pela ligação dos espermatozoides nas células da granulosa, realizando a IAIF como descrito por Parlevliet et al. (2005) com 500×10^6 espermatozoides, em uma égua em estro com folículo dominante com diâmetro maior que 35 mm. Quatro horas após a IAIF, a égua foi eutanasiada e o folículo injetado foi coletado. Através de microscopia eletrônica de transição, observou-se a ligação dos espermatozoides às células da granulosa, como se estes tivessem sido fagocitados.

Em bovinos, existe apenas um relato do uso da IAIF como alternativa para vacas leiteiras com problemas de infertilidade, durante os períodos mais quentes do ano (LÓPEZ-GATIUS e HUNTER, 2011). Neste trabalho, foram utilizadas 50 vacas de alta produção de um rebanho com histórico de 10% de gestações após IAUI. As vacas tiveram o estro detectado por visualização de sinais de cio, confirmado por palpação retal. Dezesete vacas receberam IAIF e 33 receberam IAUI com aproximadamente 5×10^6 espermatozoides. As taxas de prenhez foram de 23,5% após IAIF e 9.0% após IAUI.

Apesar de alguns resultados positivos com a utilização da IAIF em humanos, trabalhos com a utilização da técnica em animais de produção não comprovaram a hipótese de que a IAIF poderia ser utilizada em programas de IA enquanto que, em bovinos, resultados promissores foram obtidos no único estudo disponível. Portanto, justifica-se o melhor estudo da técnica, especialmente da interação entre as células espermáticas e o ambiente folicular da fêmea bovina.

2.1.1 Cinética espermática

A avaliação da cinética espermática pode ser utilizada como parâmetro de avaliação da qualidade dos espermatozoides. Um dos principais parâmetros avaliados na cinética espermática é a motilidade. A motilidade espermática se baseia na avaliação quantitativa do número de espermatozoides com movimento (CBRA, 2013). Sua avaliação é atribuída em percentagem (0-100%) e pode ser classificada em motilidade total e progressiva. A avaliação da motilidade espermática por microscópio óptico é considerada subjetiva (CBRA, 2013). Avaliações consideradas objetivas são realizadas através de sistemas computadorizados, como o CASA (AMANN e KATZ, 2004). Os sistemas computadorizados utilizam o movimento da cabeça do espermatozoide para mensuração de seu movimento. Embora o flagelo seja o responsável pela motilidade, sua movimentação não é utilizada como parâmetro, pois os movimentos flagelares são muito difíceis de serem avaliados (MATOS et. al., 2008).

Os principais parâmetros avaliados pelo sistema CASA são: motilidade total (MT), total de espermatozoides com movimentos; motilidade progressiva (MP), total de espermatozoides vivos e com movimento unidirecional; velocidade curvilínea (VCL), velocidade da trajetória real do espermatozoide; velocidade linear progressiva (VSL), velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o

último ponto da trajetória do espermatozoide; velocidade média da trajetória (VAP), velocidade da trajetória média do espermatozoide; amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real; frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento; retilinearidade (STR), relação percentual entre VSL e VAP; e linearidade (LIN), relação percentual entre VSL e VCL (MATOS et. al., 2008).

2.2 Associação entre os níveis de estrógeno e diâmetro folicular

Sabe-se que o diâmetro do folículo pré-ovulatório está diretamente relacionado com a produção de E2 (VASCONCELOS et al., 2001) e com a taxa de prenhez subsequente (COLAZO et al., 2015). A indução da ovulação de folículos com diâmetro maior ou igual a 11 mm, com hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (100 ug (2 ml) de Cystorelin i.m.) em vacas de corte resultou em menores taxas de prenhez e em aumento de perdas embrionárias, quando comparados as vacas com folículos menores (PERRY et al., 2005). Esta queda na fertilidade estaria associada a baixas concentrações de E2 no momento da IA de vacas com folículos menores e com uma menor produção de P4 nos momentos seguintes à ovulação. Santos et al. (2010) avaliando a influência do período de dominância folicular, observaram que as vacas que ovularam folículos maiores tiveram maiores concentrações séricas de E2 comparadas as vacas que ovularam folículos de menor diâmetro.

Avaliando a relação entre o tamanho do folículo pré-ovulatório, a produção de E2 e a taxa de prenhez, observou-se que novilhas que ovulam folículos com 12,8 mm de diâmetro tiveram maiores taxas de prenhez quando comparadas às que ovularam folículos menores que 10,7 mm (PERRY et al., 2007). Entretanto, novilhas que ovularam folículos maiores que 15,7 mm também tiveram menores taxas de prenhez quando comparadas a novilhas que ovularam folículos de 12,8 mm. Neste estudo também se observou maior concentração circulante de E2 em novilhas que manifestaram estro, embora sem correlação com o diâmetro do folículo. Portanto, fica evidente que os níveis de estrógeno durante o proestro estão associados com a fertilidade em bovinos.

2.3 Ação dos hormônios esteroides sobre o desenvolvimento embrionário e o ambiente uterino

Os níveis de esteroides interferem diretamente no ambiente uterino e no estabelecimento da gestação. Os elevados níveis de P4 nos períodos iniciais de gestação de bovinos contribuem para um maior desenvolvimento embrionário, e também para uma maior liberação de interferon-tau pelo embrião, facilitando o reconhecimento da prenhez e a implantação do embrião, em torno de 16-17 dias de gestação (KATAGIRI e MORIYOSHI, 2013). Além disso, alterações nos níveis de E2 no proestro resultam em alterações na expressão de receptores para E2 e P4 no endométrio (BINELLI et al., 2014). Segundo Madsen et al. (2015), vacas ovariectomizadas que foram receptoras de embriões bovinos transferidos no D7, mas não receberam estradiol exógeno no período pré-ovulatório (para simular o estradiol que seria liberado naturalmente neste período), apresentaram perdas gestacionais, provavelmente devido a falhas no reconhecimento da gestação.

Até o presente momento foram identificadas poucas rotas de sinalização envolvidas na mediação dos efeitos do E2 e P4 sobre o ambiente uterino. A rota do fator de crescimento epidermal (EGF) está relacionada com o crescimento do útero e da vagina e com a diferenciação das células endometriais (KATAGIRI e TAKAHASHI, 2004). Em vacas que não apresentam problemas reprodutivos, dois picos nos níveis de EGF no endométrio ocorrem durante o ciclo estral, entre os dias 2-4 e 13-14, com menor concentração no D7. Por outro lado, vacas com baixa fertilidade apresentam alterações nas concentrações de EGF e não apresentam estes dois picos (KATAGIRI e TAKAHASHI, 2004). Rotas relacionadas ao fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) também podem estar envolvidas, associadas à atividade mitótica e à diferenciação celular, com possíveis ações de modulação em nível uterino. Em ratas, foi demonstrado que a elevação dos níveis de IGF-1 pode aumentar as perdas embrionárias (KATAGIRI et al. 1996).

Araújo et al. (2015) avaliaram a expressão gênica de receptores para E2 (*ESR2*), P4 (*PGR*) e ocitocina (*OXTR*) no endométrio de vacas submetidas a diferentes perfis endócrinos pré-ovulatórios. Além disso, determinaram a expressão de genes relacionados à manutenção da gestação em bovinos (*SLC2A1*, *AKR1C4*, *LPL* e *SERPINA14*) em diferentes porções do endométrio e da vagina, em vacas com ovulação de folículos grandes ou pequenos. Vacas com folículos maiores tiveram maior expressão de *ESR2*, *AKR1C4*, *LPL*, *SLC2A1* e *SERPINA14*, mas

menor expressão de *PGR* e *OXTR* no endométrio (ARAÚJO et al., 2015). Forde et al. (2012), avaliando o efeito de baixa concentração de P4 no transcriptoma endometrial de vacas, relataram alteração na expressão de 498 genes, no sétimo dia do ciclo estral, e de 351 genes no dia 13º dia do ciclo. Portanto, os níveis de esteroides circulantes estão associados com o padrão de expressão gênica no endométrio. Acredita-se que um proestro adequado seja importante para preparar o útero para o estabelecimento e manutenção da gestação.

2.4 Perfil endócrino e imunidade do trato reprodutivo

Os níveis de E2 e P4 também interferem na imunidade do trato reprodutivo de bovinos. Vacas são mais propensas a infecções uterinas no diestro, quando há predominância de P4, sendo que nesta fase do ciclo estral elas possuem mais agentes imunossupressores capazes de inibir a proliferação de linfócitos (SEGERSON et al., 1984). Entretanto, Chacin et al. (1990) não observaram diferença na atividade funcional de células de defesa (polimorfonucleares) no útero de vacas nas diferentes fases do ciclo estral, nem após tratamentos com esteroides, o que evidencia que a atividade de leucócitos no trato reprodutivo feminino ainda não é claramente elucidada.

Vacas no proestro e no estro apresentam elevados níveis de E2, o que favorece uma maior motilidade uterina, estimulando a eliminação mecânica de microrganismos (AL-EKNAH e NOAKES, 1989). Em ratas, observou-se maior secreção de imunoglobulinas (IgG e IgF) durante o proestro e o estro do que no diestro (WIRA e SANDOE, 1977). Em porcas, há presença de maior número de células de defesa e maior imunidade local durante o estro (HUSSEIN et al., 1983). Portanto, embora o efeito da P4 sobre a imunidade uterina seja controverso, maiores níveis de E2 parecem favorecer um ambiente uterino livre de processos infecciosos.

2.5 Exposição prolongada a esteroides em protocolos de Indução Artificial da Lactação (IAL)

Hormônios esteroides como o E2 e P4 são fundamentais para o estabelecimento da gestação (SPENCER et al., 2007), sendo metabolizados de forma acelerada em vacas com alta produção leiteira (SANGSRITAVONG et al., 2002). Com o decorrer da gestação, ocorre o desenvolvimento da glândula mamária. Fisiologicamente, o desenvolvimento final dos ductos e do sistema lóbulo-alveolar

das glândulas mamárias exige a presença simultânea de E2 e P4, os quais são liberados naturalmente pelos ovários e pela placenta na gestação (TUCKER, 1987). A administração exógena destes hormônios pode ocasionar IAL, o que é interessante no caso de vacas que não estejam gestando devido a problemas reprodutivos, mas que possuam alto potencial para produção de leite. Vacas com metabolismo acelerado frequentemente apresentam problemas reprodutivos, os quais podem resultar em seu descarte ou na sua venda por um preço aquém do seu real valor. Desta forma, a IAL em vacas com bom potencial de produção leiteira, a partir da administração exógena de hormônios esteroides, poderia evitar prejuízos com o seu descarte, reduzindo também despesas com a aquisição de novilhas para reposição (MAGLIARO et al., 2004).

Estudos sobre a IAL em fêmeas bovinas são realizados desde a década de 1940 (WALKER e STANLEY, 1941), sendo que os protocolos usados comercialmente podem induzir lactação em 80 a 90% das vacas tratadas. Os protocolos utilizados atualmente são similares ao proposto por Freitas et al. (2010), com aplicações de P4, E2, prostaglandina (PG) e corticoides, associados ou não a somatotropina bovina (bST), com aproximadamente 21 dias de duração. A exposição a estes hormônios é capaz de modular a função reprodutiva, permitindo que vacas submetidas à IAL retomem suas atividades reprodutivas em ciclos subsequentes (FREITAS et al., 2010; MELLADO et al., 2011). Entretanto, não há estudos que avaliem os mecanismos através dos quais os protocolos de IAL modulam as funções do eixo hipotálamo-hipófise-gônada e útero.

Portanto, avaliar rotas de sinalização estrógeno-dependentes, padrão de células e resposta inflamatória uterina e perfil hormonal de animais submetidos à exposição prolongada a estrógenos é necessário para esclarecer possíveis mecanismos envolvidos na infertilidade bovina.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

Bovine sperm cells motility after incubation in follicular fluid

Sergio Farias Vargas Júnior, Vitória Gasperin Guazzelli Costa, Fernando Caetano de Oliveira, Karina Lemos Goularte, Cristina Sangoi Haas, Bernardo Garziera Gasperin e Thomaz Lucia Jr.

Artigo publicado na Revista *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.53, n.7, p.866-869, 2018

DOI: 10.1590/S0100-204X2018000700011

1 **Bovine sperm cells motility after incubation in follicular fluid**

2 Sergio Farias Vargas Júnior⁽¹⁾, Vitória Gasperin Guazzelli Costa⁽¹⁾, Fernando Caetano de
3 Oliveira⁽¹⁾, Karina Lemos Goularte ⁽¹⁾,Cristina Sangoi Haas⁽¹⁾, Bernardo Garziera Gasperin⁽¹⁾ e
4 Thomaz Lucia Jr. ⁽¹⁾

5 ⁽¹⁾Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Campus Universitário s/nº, CEP
6 96010-900, Capão do Leão, RS, Brasil. E-mails: juniorfvargas@hotmail.com,
7 vitoria.guazzelli@hotmail.com, fcoliveiravet@gmail.com, kgoularte@hotmail.com,
8 cristinasangoi@gmail.com, bbgasperin@gmail.com e tluciajr@gmail.com.

9
10 Abstract – The objective of this work was to evaluate sperm cells motility following
11 intrafollicular insemination (IFAI) or after incubation in follicular fluid. In the *in vivo*
12 experiment, IFAI was performed followed by follicular aspiration (1 to 4h after IFAI) to
13 recover follicular content and evaluate sperm motility. In the *in vitro* experiment, the
14 spermatozoa from a pool of frozen-thawed semen were evaluated for their kinetics after
15 incubation pure (pool; control group) or in follicular fluid (FF) for 1 to 3h. A low motility of
16 sperm cells after incubation in follicular fluid both *in vitro* and *in vivo* was observed. *In vitro*,
17 the main negatively affected parameters in sperm incubated in FF, compared to the control
18 group, were total motility (TM), progressive motility (PM), curvilinear distance (DCL) and
19 straightness (STR), after 1h of incubation, and TM, PM, average path velocity (VAP) and
20 curvilinear velocity (VCL) after 3h of incubation. In conclusion, the ovarian follicle and FF
21 do not provide a suitable environment to maintain bovine sperm cell motility.

22 Index terms: infertility, insemination, spermatozoa.

23 **Motilidade de espermatozoides bovinos após incubação em fluido folicular**

24
25 Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a motilidade de espermatozoides após
26 inseminação artificial intrafollicular (IAIF) ou após incubação em fluido folicular. No
27 experimento *in vivo*, a IAIF foi realizada com posterior recuperação do conteúdo folicular (1 a

28 4h após IAIF), para avaliação da motilidade espermática. No experimento *in vitro*, os
29 espermatozoides de um *pool* de doses comerciais foram avaliados quanto à sua cinética após
30 incubação *in vitro*, puros (*pool*) ou em fluido folicular (FF), por até 3h. Observou-se baixa
31 taxa de sobrevivência dos espermatozoides, tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vitro*, os principais
32 parâmetros negativamente afetados nas células espermáticas incubadas em FF, em
33 comparação ao grupo controle (*pool*), foram motilidade total (MT), motilidade progressiva
34 (MP), distância curvilínea (DCL) e retilinearidade (STR), após 1h de incubação, e MT, MP,
35 velocidade média da trajetória (VAP) e velocidade curvilínea (VCL), após 3h de incubação.
36 Conclui-se que o folículo ovariano e o FF não proporcionam um ambiente adequado para a
37 manutenção da motilidade dos espermatozoides bovinos.

38 Termos para indexação: infertilidade, inseminação, espermatozoides.

39

40 Intrafollicular artificial insemination (IFAI) is the introduction of sperm cells inside a
41 pre-ovulatory follicle through transvaginal intrafollicular injection (Lucena et al., 1991). This
42 assisted reproduction technique was first performed in women, as an alternative to infertility
43 treatment, for couples that did not respond to *in vitro* fertilization (IVF) (Lucena et al., 1991;
44 Lucchini et al., 2012). In domestic animals, IFAI was first performed in mares to overcome
45 uterine abnormalities and potentiate the use of frozen-thawed semen (Eilts et al., 2002). In
46 cattle, there is only one report in which an increase in pregnancy rate was obtained following
47 IFAI in cows with low fertility records due to heat stress (López-Gatius & Hunter, 2011).
48 Considering that this previous study did not investigate the interaction between bovine sperm
49 cells and follicular fluid (FF) after IFAI, the hypothesis that sperm deposition inside pre-
50 ovulatory follicles allows the maintenance of sperm cell viability still needs confirmation. The
51 objective of this work was to evaluate sperm motility after *in vivo* IFAI followed by follicular
52 aspiration and after *in vitro* incubation in FF.

53

54 The *in vivo* experiment was performed in Pelotas, Rio Grande do Sul (RS), Brazil and
55 was approved by the Experimental Animal Ethics Committee from Universidade Federal de
56 Pelotas (UFPel). Six adult cyclic non-lactating Jersey cows grazing on natural pasture were
57 submitted to a synchronization protocol as follows: Day 0: i.m. injection of 2mg estradiol
58 benzoate (Gonadiol[®], Zoetis, Guarulhos, São Paulo, Brazil) and insertion of an intravaginal
59 device (IVD) containing 1g progesterone (DIB[®], Zoetis, São Paulo, Brazil), which was kept
60 for eight days. At the time of IVD withdrawal, all cows received 0.5 mg sodium cloprostenol
61 i.m. (Ciosin[®], Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA) and the evaluation of follicular
62 dynamic was initiated. Follicle diameter was evaluated daily through transrectal
63 ultrasonography until the largest, healthy, dominant follicles reached a diameter of at least 10
64 mm. Then, pre-ovulatory follicles were injected with 100 μ L of cooled semen from a bull
65 collected at the same day of IFAI and diluted (1:1) in Tris-egg yolk extender. Semen was
66 preheated at 37 °C prior to injection and 20×10^6 viable sperm cells were injected per follicle
67 (initial motility/vigor: 60%/3; and final (at the end of the experiment) motility/vigor: 40%/2).
68 All semen evaluations in the study were performed according to CBRA (2013) standards.

69 The IFAI procedure was performed using a two-needle system (adapted from Gasperin
70 et al., 2012). The inner needle (25G 3 ½"; BD, USA) was attached to an embryo transfer gun
71 containing a 250 μ L semen straw. The inner system was introduced in a 35cm metal cannula
72 attached to a 20G needle (0.8mm x 40mm; Becton, Dickinson and Company, USA). The two-
73 needle system was inserted in an ovum pick-up guide with a 5/7.5 MHz micro-convex
74 transvaginal transducer attached to an AquilaVet Ultrassound (PieMedical). After caudal
75 epidural anesthesia, the ovaries were handled through transrectal manipulation to introduce
76 the external needle close to the target follicle through ovarian stroma. When the follicle was
77 in adequate position, the outer needle was advanced until its tip became visible 2 mm away
78 from the follicle wall. Then, a second operator pushed the inner needle forward and

79 performed the IFAI. Follicles were aspirated using the same equipment, but without the inner
80 system, from 1 to 4h (2.5 ± 0.8 h) after IFAI and a 10 μ L aliquot of FF containing sperm cells
81 was analyzed using an optic microscope (40x; Olympus CHK2-F-GS, São Paulo, Brazil) to
82 assess sperm motility using a scale from 0 to 100% (CBRA, 2013).

83 The *in vitro* experiment was performed with a pool from eight commercial semen
84 straws from different bulls (Maya Genetics, Bagé, Brazil) that was incubated in its own
85 extender (control group) or diluted in bovine FF obtained from five preovulatory follicles
86 from cyclic cows that were grazing on natural pasture through follicular aspiration (Galli, et
87 al., 2014). The pool was kept in micro-centrifuge tubes on a heated plate at 37 °C. Then,
88 5×10^6 sperm cells were added to 400 μ L of FF in four-well dishes. The experiment was
89 performed in quadruplicates. At each moment (0, 1 and 3h) four wells were evaluated for each
90 treatment. Sperm kinetics was assessed through computer-assisted sperm analysis (CASA;
91 SpermVision[®]3.5, Minitube, Tiefenbach, Germany) using an optic microscope (200x
92 magnification; Axio Scope A1[®], Zeiss, Jena, Germany). Data with normal distribution before
93 or after arcsine transformation were compared by analysis of variance and Tukey's test. For
94 non-normal data, Kruskal–Wallis non-parametric analysis of variance was used.

95 In the *in vivo* experiment, three cows had two follicles inseminated whereas the other
96 three had only one follicle inseminated, totaling nine injected-follicles from six cows.
97 Because it is impossible to take the CASA equipment to the animal handling facility, FF
98 samples containing sperm cells were analyzed under an optic microscope. Furthermore, the
99 presence of blood cells in FF recovered after intrafollicular insemination and follicular
100 aspiration procedures would affect CASA evaluation. Live spermatozoa were obtained at all
101 time-points, but in low concentration and with low motility. From nine samples, only five
102 presented live sperm cells with at most 10% motility, whereas the semen kept in a thermal
103 box diluted 1:1 in the extender had a final motility of 40%. Due to the reduced number of

104 recovered sperm cells, no statistical analysis was performed.

105 In the *in vitro* experiment, sperm kinetics parameters were compared between control
106 and FF groups after incubation for 1 or 3h. At the beginning of incubation period (0h), no
107 statistical analysis was performed. After 1h of incubation, total motility (TM), progressive
108 motility (PM), curvilinear distance (DCL) and straightness (STR) were lower ($P<0.05$) for
109 sperm cells incubated in FF group (Table 1). After 3h, the FF group presented reduced TM,
110 PM, average path velocity (VAP) and curvilinear velocity (VCL) compared to the control
111 group. It is important to highlight that sperm cells incubated in FF presented less than 10%
112 motility after just 1h, whereas cells from the pool still have motility greater than 20% after 3h
113 of incubation *in vitro*.

114 Despite 20×10^6 sperm cells were injected inside pre-ovulatory follicles in the *in vivo*
115 experiment, a reduced number of cells was recovered after follicular aspiration. A possible
116 explanation for the low cell recovery may be the phagocytic activity of cumulus oophorus
117 cells, as it was previously demonstrated that spermatozoa phagocytosed by corona cells were
118 incorporated into digestion vacuoles (Pijnenborg et al., 1985). It is also possible that
119 granulosa cells also have this phagocytic activity against spermatozoa, since under natural
120 circumstances cells from the ejaculate do not come into contact with granulosa cells. In
121 equine species, using electronic microscopy, spermatozoa have been observed to be bound to
122 granulosa cells, suggesting phagocytosis (Eilts et al., 2006).

123 The follicular environment of pre-ovulatory follicles does not allow sperm cell
124 viability to be maintained for prolonged periods in cows. The exact reasons for this low
125 viability after incubation in FF *in vivo* or *in vitro* are unknown, however, there are some
126 possible explanations. Hamdi et al. (2010) demonstrated that high-density lipoprotein (HDL),
127 a component of follicular fluid, triggers sperm hyperactivation as early as one minute after
128 incubation. Although sperm capacitation is crucial for fertilization, premature capacitation can

129 induce sperm cell death before oocyte nuclear maturation. Also, the glycosaminoglycan
130 hyaluronic acid, present in the expanded cumulus cells, specially before ovulation, induces
131 sperm capacitation and acrosome reaction (Kim et al., 2013). Furthermore, it was previously
132 demonstrated that FF has a detrimental effect on stallion sperm viability, which can be
133 prevented by heat inactivation or filtration (Leemans et al., 2015). Accordingly, previously
134 heated (56°C for 30 min) follicular fluid from women efficiently induced human sperm
135 motility for up to 12h *in vitro* (Getpook and Wirotkarun, 2007). However, in the present study
136 in both *in vivo* and *in vitro* experiments, FF samples were not submitted to any procedure.

137 In disagreement with our results, studies conducted in humans demonstrate that IFAI
138 is a promising tool to overcome primary infertility. Tocci & Luchini (2011), after performing
139 IFAI, obtained four (44.4%; 4/9) pregnancies diagnosed on day 16 (tested positive for beta-
140 hCG), being three (33.3%; 3/9) later confirmed by ultrasonography (six weeks). In another
141 study, greater pregnancy rates following IFAI (29%) in comparison to intrauterine
142 insemination (11%) has been reported (Lucchini et al., 2012). However, in both studies,
143 women were submitted to a stimulation protocol ensuring strict control of ovulation,
144 performing IFAI 36h after hCG (immediately before ovulation). Based on our results, it is
145 possible to infer that IFAI is suitable when performed just before ovulation, since the
146 follicular environment and FF are not suitable for maintaining sperm viability for long
147 periods.

148 **References**

149 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de
150 sêmen de animal, 3ed. Belo Horizonte: CBRA; 2013.

151 EILTS, B.E.; PINTO, C.R.F.; PACCAMONTI, D.L.; NIEMANSTVERDREIT, A.S.;
152 GARCIA, E.; GODKE, R.A. Transvaginal intrafollicular sperm cell injection with
153 concomitant artificial insemination in the cyclic mare. **Theriogenology**, v.58, p.631-633,
154 2002.

- 155 EILTS, B.E.; LYLE, S.K.; BORKHSENIUS, O.N.; HENK, W.G.; PACCAMONTI, D.L.;
156 FERRER, M.S. Spermatozoal binding and phagocytosis by granulosa cells after intrafollicular
157 insemination. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.326-330, 2006.
- 158 GALLI, C.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Ovum pick up,
159 intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and
160 horses: from the research laboratory to clinical practice. **Theriogenology**, v.81, p. 138-151,
161 2014.
- 162 GASPERIN, B.G.; FERREIRA, R.; ROVANI, M.T.; SANTOS, J.; BURATINI, J.; PRICE,
163 C.A.; GONÇALVES, P.B.D. FGF10 inhibits dominant follicle growth and estradiol secretion
164 in vivo in cattle. **Reproduction**, v.143, p.815 - 823, 2012.
- 165 GETPOOK, C.; WIROTKARUN, S. Sperm motility stimulation and preservation with
166 various concentrations of follicular fluid. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**,
167 v.24, p. 425–428, 2007.
- 168 HAMDI, S. M.; VIEITEZ, G.; JASPARD, B.; BARBARAS, R.; PERRET, B.; MIEUSSET,
169 R.; PARINAUD., J.; COLLET, X. Effects of human follicular fluid and high-density
170 lipoproteins on early spermatozoa hyperactivation and cholesterol efflux. **Journal of Lipid**
171 **Research**, v.51, p.1363-1369. 2010.
- 172 KIM, E.Y., NOH. E.H., NOH, E.J., PARK, M.J., PARK, H.I., LEE, D.S., RIU, K.Z., PARK,
173 S.P. Effect of Glycosaminoglycans on In vitro Fertilizing Ability and In vitro Developmental
174 Potential of Bovine Embryos. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v.26, p.178-
175 188, 2013.
- 176 LEEMANS, B.; GADELLA, B.M.; STOUT, T.A.; NELIS, H.; HOOGEWIJS, M.; VAN
177 SOOM, A. An alkaline follicular fluid fraction induces capacitation and limited release of
178 oviduct epithelium-bound stallion sperm. **Reproduction**, v. 150, p.193-208, 2015.
- 179 LÓPEZ-GATIUS, F.; R. HUNTER. Intrafollicular insemination for the treatment of infertility

- 180 in the dairy cow. **Theriogenology**, v.75, p.1695-1698. 2011.
- 181 LUCCHINI, C.; VOLPE, E.; TOCCI, A. Comparison of intrafollicular sperm injection and
182 intrauterine insemination in the treatment of subfertility. **Journal of Assisted Reproduction
183 and Genetics**, v.29, p.1103-1109. 2012.
- 184 LUCENA, E.; RUIZ, J.A.; MENDOZA, J.C.; LUCENA, A.; LUCENA, C.; ARANGO, A.
185 Direct intrafollicular insemination. A case report. **The Journal of Reproductive Medicine**,
186 v.36, p.525-526. 1991.
- 187 PIJNENBORG, R.; GORDTS, S.; ONGKOWIDJOJO, R.; BROSENS, I. Sperm phagocytosis
188 by corona cells in a human *in vitro* fertilization system. **Annals of the New York Academy
189 of Sciences**, v.442, p.310-317. 1985.
- 190 TOCCI, A.; LUCCHINI C. Feasibility and results of a modified intrafollicular insemination
191 technique for treating primary infertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**,
192 v.28, p.821-824. 2011

193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216

Table 1. Sperm kinetics parameters after in vitro incubation at 37 °C for 1 or 3h in their own extender (pool; control group) or in bovine follicular fluid⁽¹⁾.

Parameter	Incubation period				
	0 h		1 h		3 h
	<i>Pool</i>	<i>Pool</i>	FF	<i>Pool</i>	FF
TM	38.4 ± 4.3	38.3 ± 3.7 ^a	5.4 ± 3.7 ^b	26.3 ± 3.7 ^a	4.1 ± 3.7 ^b
PM	27.8 ± 4.2	28.7 ± 2.3 ^a	2.4 ± 2.3 ^b	20.9 ± 2.3 ^a	2.7 ± 2.3 ^b
DAP	28.0 ± 3.1	25.1 ± 5.9	19.4 ± 5.9	28.1 ± 5.9	18.5 ± 5.9
DCL	46.8 ± 6.6	42.2 ± 9.1 ^a	28.6 ± 9.1 ^b	48.3 ± 9.1	30.2 ± 9.1
DSL	21.2 ± 2.7	17.4 ± 5.4	17.0 ± 5.4	19.6 ± 5.4	16.2 ± 5.4
VAP	62.9 ± 6.4	57.8 ± 12.6	48.1 ± 12.6	64.5 ± 12.6 ^a	39.8 ± 12.6 ^b
VCL	104.7 ± 13.7	96.8 ± 20.0	71.6 ± 20.0	110.2 ± 20.0 ^a	65.1 ± 20.0 ^b
VSL	47.7 ± 5.6	40.2 ± 11.7	42.5 ± 11.7	44.9 ± 11.7	34.7 ± 11.7
STR	0.8 ± 0.01	0.7 ± 0.2 ^a	0.9 ± 0.2 ^b	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.2
LIN	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
WOB	0.6 ± 0.01	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1
ALH	2.9 ± 0.2	3.4 ± 0.6	2.2 ± 0.6	3.6 ± 0.6	1.8 ± 0.6
BCF	30.5 ± 0.5	28.7 ± 6.5	35.2 ± 6.5	28.4 ± 6.5	24.2 ± 6.5

217 ⁽¹⁾Means followed by different letters indicate significant differences by Tukey test at 5% probability.
218 Total Motility (TM), Progressive Motility (PM), Distance of Average Path (DAP), Curvilinear Distance (DCL),
219 Distance Straight Line (DSL), Average Path Velocity (VAP), Curvilinear Velocity (VCL), Straight-line Velocity
220 (VSL), Straightness (STR), Linearity (LIN), Wobble (WOB), Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH),
221 Beat Cross Frequency (BCF). The experiment was performed in four replicate

3.2 Artigo 2

Avaliação gênica uterina e perfil endócrino em vacas submetidas à prolongada exposição a estrógeno

Sergio Farias Vargas Júnior; Henrique Schneider Pestano; Fernando Caetano de
Oliveira; Juliana Germano Ferst; Cristina Sangoi Haas; Arnaldo Diniz Vieira;
Bernardo Garziera Gasperin; Thomaz Lucia Jr;

Será submetido à revista *Animal Reproduction*

1 **Avaliação gênica uterina e perfil endócrino em vacas submetidas à prolongada**
2 **exposição a estrógeno**

3
4 Sergio Farias Vargas Júnior^{1*}; Henrique Schneider Pestano¹; Fernando Caetano de Oliveira¹;
5 Juliana Germano Ferst²; Cristina Sangoi Haas¹; Arnaldo Diniz Vieira¹; Bernardo Garziera
6 Gasperin¹; Thomaz Lucia Jr¹;

7
8 ¹ ReproPel, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

9 ² BioRep, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa
10 Maria, RS, Brasil.

11 *Endereço para correspondência: juniorfvargas@hotmail.com

12
13 **Resumo:** Este trabalho teve por objetivos: determinar os níveis séricos de E2, P4 e cortisol
14 em vacas submetidas a longos períodos de exposição ao estrógeno; identificar as alteração de
15 genes associados com a nutrição e manutenção da gestação, receptores de P4, E2 e ocitocina
16 (OT) no útero e alterações citológicas no endométrio dos animais após a exposição ao
17 tratamento com estrógeno. Para isto, foram delineados dois experimentos. No primeiro, foram
18 coletadas amostras de vacas (n=7) (sangue, biopsia uterina e amostra para citologia) no
19 proestro seis dias antes de um protocolo adaptado de indução artificial da lactação e 55 dias
20 após. No segundo experimento, vacas (n=10) foram alocadas a dois grupos, tratados com
21 fontes diferentes de estrógeno (n = 5 por grupos): um grupo recebeu uma aplicação de
22 benzoato de estradiol, e o outro recebeu uma aplicação de cipionato de estradiol. No D0
23 (início do protocolo de IAL) do primeiro experimento, as fêmeas apresentavam $51,4 \pm 11$
24 pg/ml de estradiol, mas apresentaram maiores níveis nos dias 2, 4, 8, 10 e 13 ($P < 0,05$),
25 atingindo até 4.000 pg/ml no D4. Os níveis de P4 foram superiores a 6 ng/ml no D0 e durante

26 o período de aplicação hormonal as vacas induzidas mantiveram níveis acima de 6 ng/ml,
27 retornando aos níveis basais no D8. Após o tratamento, o receptor *OXTR* (ocitocina)
28 apresentou menor expressão ($P < 0,05$), enquanto o receptor *PGR* (progesterona) e o gene
29 *SERPINA14* apresentaram aumento na expressão ($P < 0,07$) no endométrio das vacas. No
30 segundo experimento observou-se diferença entre os níveis de estrógeno entre os grupos ($P <$
31 $0,05$), nas horas 24, 48 e 60. Os animais apresentaram níveis elevados de E2 ao longo da
32 exposição a estrógenos, entretanto níveis similares de P4 aos obtidos no diestro pela produção
33 endógena do CL. A modulação gênica exercida nos receptores de *OXTR*, *PRG* e no gene de
34 *SERPINA14* sugerem que a prolongada exposição a estrógenos influencia o ambiente uterino
35 de vacas tratadas. A prolongada exposição a estrógenos não foi capaz de induzir modificações
36 no padrão celular no endométrio de vacas no proestro depois do tratamento.

37 **Palavras-chaves:** Indução Artificial da Lactação, progesterona, estradiol, infertilidade,
38 biópsia uterina.

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51 **Introdução**

52 Hormônios esteroides como a progesterona (P4) e o estradiol (E2) são fundamentais
53 para o estabelecimento e manutenção da gestação em bovinos (Binelli et al., 2014; Mann et
54 al., 2006). Vacas leiteiras de alta produção possuem o metabolismo acelerado, metabolizando
55 rapidamente estes hormônios (Sangsritavong et al., 2002), o que resulta em redução nos seus
56 níveis circulantes durante períodos críticos durante o ciclo estral e gestação, podendo se
57 refletir em aumento da ocorrência de vacas repetidoras de cio.

58 Após a fecundação, níveis reduzidos de P4 tornam o ambiente uterino menos
59 apropriado para o desenvolvimento embrionário, em função da menor secreção de Interferon-
60 tau pelo trofoblasto (revisado por (Katagiri e Moriyoshi, 2013)). Por outro lado, vacas que
61 ovulam folículos maiores (com maiores níveis pré-ovulatórios de E2) tem maior expressão de
62 receptores de P4 e E2 no endométrio, o que provavelmente contribui para melhorar o
63 ambiente uterino, favorecendo o reconhecimento embrio-materno e a implantação do embrião
64 (revisado por (Binelli et al., 2014)). Em vacas ovariectomizadas submetidas a transferência de
65 embriões foi demonstrado que a administração exógena de E2 no período pré-ovulatório
66 diminuiu as perdas gestacionais, comparadas com animais que não receberam tratamento
67 (Madsen et al., 2015). Além disso, os níveis séricos de E2 e P4 modulam genes diretamente
68 relacionados a implantação e manutenção da gestação. Diferentes perfis endócrinos pré-
69 ovulatórios influenciam diretamente na expressão de receptores de P4, E2 e ocitocina (OT),
70 além da expressão de genes relacionados à manutenção da gestação em bovinos (SLC2A1,
71 AKR1C4, LPL e SERPINA14) (Araújo et al., 2015).

72 A indução artificial da lactação (IAL) é uma técnica que faz com que vacas não
73 gestantes produzam leite através da mimetização hormonal exógena do periparto (Mellado et
74 al., 2014), ou seja, níveis elevados de estrógeno e progesterona. Os protocolos descritos na
75 literatura envolvem a administração de benzoato (BE) ou cipionato de estradiol (ECP) e P4

76 injetável por cerca de sete dias, seguido de aplicação de BE ou ECP isoladamente por mais
77 sete dias, possibilitando uma resposta em cerca de 80-90% dos animais e uma produção de
78 65-80% do volume de leite produzido em uma lactação natural (Freitas et al., 2010; Pestano et
79 al., 2017). Além de diminuir os prejuízos com o descarte de animais, há relatos de que muitas
80 fêmeas com problemas reprodutivos e infertilidade, se tornam capazes de conceber e levar a
81 gestação a termo após o protocolo de IAL (Freitas et al., 2010; Jewell, 2002; Mellado et al.,
82 2011; Smith e Schanbacher, 1973). Entretanto, os mecanismos pelos quais estas vacas
83 retornam à fertilidade ainda não são completamente elucidados. Também não há
84 conhecimento científico sobre os níveis hormonais alcançados durante estes protocolos,
85 tampouco sobre as alterações celulares e gênicas em nível de endométrio que possibilitam que
86 fêmeas com problemas de infertilidade concebam após a exposição aos protocolos.

87 Com base no acima exposto, este trabalho teve por objetivos: determinar os níveis
88 séricos de E2, P4 e cortisol em vacas submetidas a longos períodos de exposição ao
89 estrógeno; identificar as modulações gênicas uterinas e alterações citológicas no endométrio
90 dos animais após a exposição ao tratamento com estrógeno.

91

92 **Metodologia**

93 Este estudo foi composto por dois experimentos. O Experimentos 1 foi conduzido no
94 Centro Agropecuário da Palma, Universidade Federal de Pelotas (UFPeL) no município do
95 Capão do Leão (RS). O Experimento 2 foi conduzido na Estação Experimental Terras Baixas,
96 EMBRAPA Clima Temperado, no município do Capão do Leão (RS). Os animais utilizados
97 nos dois experimentos foram mantidos em campo nativo com água *ad libitum*. Todos os
98 procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pela Comissão de Ética em
99 Experimentação Animal (CEEA-UFPeL, registros nº 23110.010524/2014-71 e
100 23110.007347/2016-15).

101 *Experimento 1: Expressão de genes e rotas de sinalização relacionados à fertilidade, em*
102 *vacas submetidas a longa exposição a P4 e E2*

103 Dezesete dias antes do início do protocolo de IAL (D-17), sete vacas leiteiras cíclicas,
104 repetidoras de serviço, com peso médio de $576,7 \pm 31,8$ kg, tiveram o estro previamente
105 sincronizado com a inserção de dispositivos intravaginais (DIV) contendo 1,0 g de P4 (DIB[®] -
106 Zoetis, São Paulo, Brasil). Simultaneamente à inserção dos DIV, foram aplicados 2 mg de BE
107 (Gonadiol[®] - Zoetis, São Paulo, Brasil). Os DIV foram mantidos por nove dias. Após a
108 remoção dos DIV, foram administrados 150 µg de cloprostenol sódico (PGF) (Prolise[®] -
109 Tecnopec Ltda, São Paulo, Brasil) por via i.m., sendo avaliada a dinâmica folicular. Dois dias
110 após a retirada dos DIV (D-6), as vacas receberam 0,021 g de acetato de buserelina (GnRH)
111 (Gonaxal[®] Biogénesis Bagó, Paraná, Brasil) e foi realizada citologia uterina seguida de
112 biopsia (técnicas que serão descritas ao final dos experimentos) sob anestesia epidural. As
113 amostras de biopsia de endométrio foram armazenadas em nitrogênio líquido para análise de
114 expressão gênica.

115 Seis dias após (D0), iniciou-se o protocolo de IAL, com a inserção de dois DIV
116 inseridos juntos, cada um contendo 1,9 g de P4 (CIDR[®] - Zoetis, São Paulo, Brasil), além de
117 aplicações diárias de 0,1 mg/kg de BE (Gonadiol[®] - Zoetis, São Paulo, Brasil), por 7 dias (até
118 o D6). No D6 foi feita a retirada dos DIVs. No D1 e no D7, foram aplicados 150 µg de
119 cloprostenol sódico (PGF) (Prolise[®] - Tecnopec Ltda, São Paulo, Brasil), no D14 e no D21
120 foram aplicados 500 mg de somatotropina bovina recombinante via s.c. (bSTr) (Boostin[®] -
121 MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil). No D19, D20 e D21 foram feitas massagens no
122 úbere, duas vezes ao dia durante 5 minutos, para estimular a liberação de prolactina endógena
123 (Freitas et al., 2010). No D21 iniciou-se a ordenha dos animais. Amostras de sangue foram
124 coletadas em D-6, D0, D2, D4, D6, D7, D8, D10, D13, D17 e D21. A dinâmica folicular foi
125 avaliada durante o experimento para monitoramento da atividade ovariana. Cinquenta e cinco

126 dias após o início do protocolo e indução, as vacas foram novamente sincronizadas através da
127 inserção de um DIV contendo 1,0 g de P4 (DIB[®] - Zoetis, São Paulo, Brasil) e aplicação de 2
128 mg de BE (Gonadio1[®] - Zoetis, São Paulo, Brasil). Nove dias após (D64), o DIV foi retirado e
129 os animais receberam 150 µg de cloprostenol sódico (PGF) (Prolise[®] - Tecnopec Ltda, São
130 Paulo, Brasil) por via i.m.. Dois dias após (D66), foi realizada nova coleta para citologia
131 através de esfregaço das células do endométrio e também biopsia uterina. As amostras de
132 endométrio foram armazenadas em nitrogênio líquido para análise de expressão gênica. Os
133 procedimentos realizados estão descritos na Fig. 1.

134 ***Experimento II: Perfil endócrino de vacas após administração de diferentes sais de***
135 ***estradiol***

136 Foram utilizadas 10 vacas Jersey, com peso médio de $473,50 \pm 27,94$ kg, não gestantes
137 e não lactantes, que receberam duas aplicações de 150 µg de cloprostenol sódico i.m. (PGF)
138 (Prolise[®] - Tecnopec Ltda, São Paulo, Brasil), em D-5 e D0. Ainda no D0, folículos com
139 diâmetro maior do que oito mm foram aspirados, para que as vacas iniciassem o estudo em
140 condições endócrinas similares. No D0, as vacas foram alocadas a dois grupos, tratados com
141 fontes diferentes de estrógeno (n = 5 em ambos): um grupo recebeu uma aplicação de 0,1
142 mg/kg de BE (i.m.); o outro recebeu uma aplicação de 0,075 mg/kg de cipionato de estradiol
143 i.m. (ECP) (ECP[®] - Zoetis, São Paulo, Brasil). No mesmo dia, nos dois grupos, de forma
144 aleatória, as vacas receberam DIV por 24h contendo diferentes doses de P4: 1 DIV com 1,0 g
145 (DIB[®] - Zoetis, São Paulo, Brasil) (n = 3); 1 DIV com 1,9 g (CIDR[®] - Zoetis, São Paulo,
146 Brasil) (n = 4); ou 2 DIV com 3,8 g (CIDR[®] - Zoetis, São Paulo, Brasil) (n = 3) (Fig. 2).

147 Foram feitas coletas de sangue após 0, 24, 48 e 60 h, para que se pudesse avaliar a
148 meia vida dos esteroides administrados. As amostras de sangue foram coletadas por punção
149 da veia caudal utilizando o sistema vacutainer[®]. As amostras foram centrifugadas a 6000 rpm,

150 durante 5 minutos para separação do soro, sendo este armazenado em nitrogênio líquido (-
151 196°C) até o momento das análises.

152 *Extração de RNA, transcrição reversa, PCR em tempo real*

153 Para investigar a expressão de RNAm de genes relacionados a fertilidade após a
154 prolongada exposição a estrógenos, obtiveram-se amostras do corpo do útero de vacas antes e
155 após esta exposição. Para quantificação da expressão gênica, o RNA total das células
156 endometriais obtidas pelas biopsias foi extraído utilizando o protocolo Trizol (Life
157 Technologies, Burlington, ON, Canadá) de acordo com as recomendações do fabricante. Para
158 gerar o cDNA, quantificou-se o RNA (NanoDrop- Thermo Scientific - Waltham, USA),
159 observando a taxa de absorção da relação OD260/OD280, utilizando apenas amostras com
160 razões acima de 1,8. O RNA total foi tratado com DNase (Amplification Grade, Life
161 Technologies) para digerir qualquer DNA contaminante. Após a inativação da DNase (65°C
162 por 10 min), a reação de transcrição reversa foi realizada com o kit iScript cDNA Synthesis
163 (BioRad Hercules, CA) conforme instruções do fabricante. A expressão relativa dos genes foi
164 realizada por PCR em tempo real (CFX384 real-time PCR; BioRad, Hercules, CA) utilizando
165 SYBR Green Supermix iQ (BioRad) e primers específicos para bovinos (Tab. 1).

166 De modo a otimizar a análise de expressão gênica, diluições em série com os cDNAs
167 de todas as amostras foram utilizadas para gerar uma curva padrão (5 pontos), que foi
168 construída através da representação gráfica do logaritmo da quantidade de partida do fator de
169 diluição em relação ao valor de Cq obtidos durante a amplificação de cada diluição. As
170 reações com coeficiente de determinação (R²) superior a 0,98 e eficiência de 95-105% foram
171 considerados otimizadas. O método da curva padrão relativa foi utilizado para avaliar a
172 quantidade de um transcrito particular, em cada amostra (Čikoš et al., 2007). As amostras
173 foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos em relação aos valores médios
174 de Cq para *GAPDH* e Ciclofilina como genes de referência.

175 *Citologia uterina*

176 As amostras foram coletadas pela técnica de escova endometrial (Cytobrush) adaptada
177 de Kasimanickam et al. (2004). Uma escova cervical não estéril (Labor Import[®]) foi adaptada
178 e inserida em um aplicador universal de sêmen para passagem através da cérvix. Após isso, a
179 escova foi exposta na ponta do aplicador, onde foi feita a coleta da amostra das células do
180 endométrio e realizado um esfregaço em lâmina.

181 Os esfregaços foram corados com Panótico Rápido (Bastos et al., 2015) para avaliação
182 do padrão das células do endométrio. As amostras foram avaliadas em microscópio ótico
183 Olympus CX 41 (Olimpus Corporation, Tokyo, Japão) em aumento de 1000x. A citologia foi
184 avaliada com base no padrão celular: presença de citoplasma, presença de núcleo isolado,
185 tamanho do núcleo, forma da célula e do núcleo e presença de leucócitos e eritrócitos. Foram
186 contadas 100 células e classificadas conforme padrão de tipo celular em: superficiais (TI),
187 intermediárias (TII), basais (TIII), neutrófilos (N) e linfócitos (L) (Brodzki et al., 2015).

188 *Biopsia endometrial*

189 As biópsias de endométrio foram feitas após a higienização da região perineal e da
190 administração de anestésico (4 ml de lidocaína 2%), pela via epidural baixa. As biópsias
191 foram realizadas pela via transcervical, utilizando uma pinça para biópsia laparoscópica, na
192 porção dorsal do corpo do útero.

193 *Dosagens hormonais*

194 A partir das amostras de soro, foram determinados os níveis P4, E2 e cortisol através
195 da técnica de eletroquimioluminescência (Bossaert et al., 2008) em laboratório privado. Para
196 os exames se considerou coeficientes de variação inter e intra-ensaio inferiores a 10%.

197 *Análise estatística*

198

199 As análises estatísticas, e correlações foram conduzidas usando o software JMP (SAS
200 Institute Inc., Cary, NC). A distribuição dos dados foi testada com o teste Shapiro-Wilk,
201 sendo os mesmos normalizados quando necessário. Os dados contínuos foram submetidos a
202 análise de variância (ANOVA). Em todas as análises, o nível de significância utilizado foi de
203 5%.

204

205 **Resultados**

206 *Experimento I*

207 Das seis vacas expostas ao protocolo de IAL, todas iniciaram a lactação no D21. Três
208 das seis vacas apresentaram estro (avaliado por observação diária), por três dias apenas, após
209 a retirada dos dispositivos de P4. Cinco vacas foram inseminadas novamente após o protocolo
210 e quatro gestaram.

211 Nas avaliações da citologia uterina foram observadas: células superficiais (Fig. 3 A e
212 C), células intermediárias (Fig. 3 A e C), células basais (Fig. 3 C), neutrófilos (Fig. 3 B) e
213 linfócitos (Fig. 3 B). As médias das quantidades de cada tipo celular estão listadas na Tab. 2.
214 Não houve diferença estatística entre os tratamentos ($P > 0,05$) no padrão de resposta
215 inflamatória, tampouco nas células uterina antes e após a exposição hormonal (Fig. 4).

216 A expressão de RNAm para *AQP4*, *CCND1*, *COLAA1*, *EGFR*, *ESR1*, *ESR2*, *GREB1*,
217 *PGRMC1*, *PGRMC2*, *PTCH2*, e *SLC2A1* no endométrio de vacas não diferiu ($P > 0,05$) antes
218 e após a exposição a estrógenos (Fig. 5). Porém, após o tratamento, o receptor *OXTR*
219 (ocitocina) apresentou menor expressão ($P < 0,05$), enquanto o receptor *PGR* (progesterona) e
220 o gene *SERPINA14* apresentaram aumento na expressão ($P < 0,05$) (Fig. 6).

221 Com relação ao perfil endócrino, no D0 as fêmeas apresentavam $51,4 \pm 11$ pg/ml de
222 estradiol, mas apresentaram maiores níveis nos dias 2, 4, 8, 10 e 13 ($P < 0,05$), atingindo até
223 4.000 pg/ml no D4 (Fig. 7A). Os níveis de P4 foram superiores a 6 ng/ml no D0,

224 evidenciando a presença de atividade luteal. Durante o período de aplicação hormonal (D0 e
225 D6) as vacas induzidas mantiveram níveis acima de 6 ng/ml, retornando aos níveis basais no
226 D8, dois dias após o término das injeções de estradiol (Fig. 7B).

227 ***Experimento II***

228 No experimento II, os animais não manifestaram estro durante o período das coletas de
229 sangue. Os dois grupos que receberam diferentes formulações de E2 apresentaram um
230 aumento nos valores de estradiol em relação aos níveis basais, mostrando que o tratamento
231 teve efeito. O grupo BE apresentou um pico nos níveis séricos de E2, ultrapassando os 2000
232 pg/mL nas 24 horas após início das aplicações, diminuindo para níveis próximos a 500 pg/mL
233 nas 60 horas. Já o grupo ECP não apresentou este pico, mas aumentou os níveis de E2 para
234 próximos de 500 pg/mL nas 24 horas, se mantendo constante até às 60 horas. Observou-se
235 que os níveis de estrógeno foram superiores no grupo tratado com BE em relação ao ECP ($P <$
236 0,05), nas horas 24, 48 e 60 (Fig. 8).

237

238 **Discussão**

239 O presente estudo demonstrou as alterações no perfil de expressão gênica no
240 endométrio de vacas antes e após a exposição prolongada a estrógenos, bem como as
241 modificações no perfil endócrino de vacas expostas a protocolo curto de IAL. Demonstrou
242 também o perfil endócrino de vacas expostas a diferentes ésteres de estradiol e as alterações
243 no padrão celular e de resposta inflamatória no endométrio dos animais no proestro antes e
244 após a exposição hormonal. No experimento I, as vacas submetidas a IAL lactaram após a
245 conclusão do protocolo, manifestando estro por três dias após o término da exposição a P4,
246 atingindo taxa de prenhez de 66,6%.

247

248 Um dos principais problemas dos protocolos de IAL é a manifestação de estro
249 exacerbada que pode predispor fraturas pélvicas nos animais (Chakriyarat et al., 1978). No
250 experimento I, as vacas manifestaram estro por apenas três dias, provavelmente devido ao fato
251 de se ter utilizado um protocolo curto de IAL, sem as administrações isoladas de E2 após o
252 fim das aplicações de P4, como o que ocorre nos protocolos tradicionais de IAL que utilizam
253 E2 por mais sete dias isoladamente (Freitas et al., 2010). Outro resultado importante foi a
254 ocorrência de uma taxa de prenhez de 66,6% após o protocolo de IAL no experimento I. Este
255 resultado corrobora com outros autores que relatam que vacas com problema de infertilidade
256 tornam-se gestante após os protocolos de IAL (Freitas et al., 2010; Mellado et al., 2011;
257 Smith e Schanbacher, 1973), o que reforça a hipótese de que a prolongada exposição a
258 estrógenos module o ambiente uterino, favorecendo o retorno a fertilidade.

259 Vacas sob a influência de E2 apresentam maior fluxo sanguíneo no útero (Rawy et al.,
260 2018) e maior grau de estímulo à divisão e proliferação celular (Fraser et al., 2008). No
261 presente estudo, se observou grande quantidade de células em diferentes graus de degeneração
262 (principalmente células TI) e também algumas células epiteliais jovens (TIII), tanto antes
263 como após a exposição ao estrógeno, indicando que ocorreu renovação celular no endométrio.
264 Dados similares foram relatados por Brodzki et al. (2015), que encontraram maior quantidade
265 de células degeneradas TI em vacas na fase folicular do ciclo estral. Entretanto, não houve
266 diferença no padrão celular do endométrio antes e depois do tratamento, sugerindo que
267 existam outros mecanismos envolvidos na retomada da fertilidade destas vacas. A avaliação
268 da quantidade de células de defesa, principalmente polimorfonucleares, é utilizada para
269 avaliação de endometrites clínicas (Sicsic et al., 2018) e subclínicas (Van Schyndel et al.,
270 2018), sendo diretamente relacionada à capacidade das vacas conceberem após o parto. A
271 exposição a estrógenos não foi capaz de modular a resposta inflamatória dos animais após o
272 tratamento, o que pode ser relacionado ao pequeno número de vacas avaliadas.

273 A prolongada exposição a estrógenos modulou a expressão dos receptores de ocitocina
274 (*OXTR*) e P4 (*PGR*) e do gene *SERPINA 14*. A expressão de *OXTR* no endométrio está
275 relacionada com a sinalização do parto e da luteólise, regulada por hormônios esteroides
276 (Revisado por (Bishop, 2013)). Ainda que o *OXTR* tenha apresentado menor expressão após
277 exposição a estrógenos, estudos demonstram que o *OXTR* apresenta menor expressão no
278 diestro (Araújo et al., 2015). Como no presente estudo as amostras foram coletadas no
279 proestro, não se pode afirmar que o tratamento influenciou na expressão de *OXTR* de acordo
280 com a fase do ciclo estral. A maior expressão de *PGR* no endométrio das vacas pós-
281 tratamento contradiz nossa hipótese, pois autores citam que a diminuição da expressão de
282 *PGR* proporcionaria um melhor ambiente para a implantação do embrião (Bazer et al., 2009;
283 Spencer et al., 2006). Um fator que influencia diretamente na expressão gênica do endométrio
284 é o local da coleta da amostra (Araújo et al., 2015), e poderia ser uma explicação para esta
285 diminuição de *PGR*. O gene *SERPINA 14* está relacionado com o transporte de proteínas e a
286 constituição do histotrofo responsável pela nutrição do concepto (Padua e Hansen, 2010). Sua
287 maior expressão pode estar relacionada com a capacidade das vacas conceberem após o
288 tratamento.

289 A mensuração do perfil endócrino de vacas submetidas a protocolos de IAL possibilita
290 nortear alternativas para os principais problemas da técnica, que são: manejo diário de
291 aplicação de grandes volumes de hormônios e a manifestação de estro exacerbado pelas vacas
292 (revisado por (Pestano et al., 2017)). Sabendo os níveis séricos de P4 necessários para IAL
293 (dados não publicados) e que o corpo lúteo (CL) produz, em média, 6 a 8 ng/ml de P4 (Mann,
294 2009), no experimento 1, foi possível obter IAL com um protocolo de curta duração,
295 utilizando 2 DIVs de 1,9 g de P4, associados a presença de CL funcionais e à aplicação de BE
296 por sete dias. Jewell (2002) mostrou que a IAL com protocolos curtos possibilitou cerca de
297 90% de sucesso e a produção de aproximadamente 70% de leite, em comparação com vacas

298 em lactação fisiológica, evidenciando que o uso de protocolos curtos é viável, já que redução
299 na produção de leite não é expressiva. A eficácia dos protocolos curtos de IAL quanto à
300 produção de leite (não avaliada em nosso estudo) ainda precisa ser melhor investigada, pois
301 protocolos curtos baseados em aplicações de estradiol 17 β , ECP ou BE também foram
302 relatados (Jewell, 2002).

303 No experimento 2, os níveis de estradiol tiveram uma curva de meia vida semelhante à
304 descrita por (Vynckier et al., 1990), evidenciando meia vida mais prolongada do ECP. Assim,
305 se o ECP for a fonte de estrógeno escolhida para o protocolo de IAL, sua aplicação poderá
306 ocorrer em intervalos mais longos.

307

308 **Conclusões**

309 A modulação gênica exercida nos receptores de *OXTR*, *PRG* e no gene de *SERPINA14*
310 sugerem que a prolongada exposição a estrógenos influencia o ambiente uterino de vacas
311 tratadas. A prolongada exposição a estrógenos não foi capaz de induzir modificações no
312 padrão celular no endométrio de vacas no proestro depois do tratamento.

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323 **Referências Bibliográficas**

- 324 **Ambrose DJ, Gobikrushanth M, Zuidhof S, Kastelic JP.** Low-dose natural prostaglandin
325 F2 α (dinoprost) at timed insemination improves conception rate in dairy cattle.
326 Theriogenology, v.83, n.4, p.529-534, 2015.
- 327 **Araújo ER, Sponchiado M., Pugliesi G., Van Hoeck V, Mesquita FS, Membrive CM,**
328 **Binelli M.** Spatio-specific regulation of endocrine-responsive gene transcription by
329 periovulatory endocrine profiles in the bovine reproductive tract. *Reproduction,*
330 *Fertility and Development.* v.28, p.1533-1545, 2015.
- 331 **Bastos YHGB, Ferreira CS, Gomes GM., Júnior KdCP, de Macedo Gomes LP, Papa**
332 **FO, Crespilho AM.** Avaliação de diferentes técnicas de coloração para esfregaços
333 obtidos por punção biópsia aspirativa testicular de bovinos. *Revista de Saúde,* v.6, n.2,
334 p.05-10, 2015.
- 335 **Bazer FW, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bayless K.** Novel pathways
336 for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *MHR:*
337 *Basic science of reproductive medicine,* v.16, n.3, p.135-152, 2009.
- 338 **Binelli M, Pugliesi G, Hoeck V, Sponchiado M, Ramos R, Oliveira M, Membrive C.** The
339 role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. *Animal*
340 *Reproduction,* p.246-253, 2014.
- 341 **Bishop CV.** Progesterone inhibition of oxytocin signaling in endometrium. *Frontiers in*
342 *neuroscience,* v.7, p.138, 2013.
- 343 **Bossaert P, Leroy J, De Vlieghe S, Opsomer, G.** Interrelations between glucose-induced
344 insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding
345 dairy cows. *J Dairy Sci,* v.91, n.9, p.3363-3371, 2008.

- 346 **Brodzki P, Brodzki A, Kurek Ł, Marczuk J, Tatara MR.** Endometrial cytology at luteal
347 and follicular phases of the ovarian cycle in cows. *Annals of Animal Science*, v.15,
348 n.1, p.107-117, 2015.
- 349 **Chakriyarat S, Head H, Thatcher W, Neal F, Wilcox C.** Induction of Lactation:
350 Lactational, Physiological, and Hormonal Responses in the Bovine¹. *J Dairy Sci*, v.61,
351 n.12, p.1715-1724, 1978.
- 352 **Čikoš Š, Bukovská A, Koppel J.** Relative quantification of mRNA: comparison of methods
353 currently used for real-time PCR data analysis. *BMC molecular biology*, v.8, n.1,
354 p.113, 2007.
- 355 **Fraser HM, Wilson H, Silvestri A, Morris KD, Wiegand SJ.** The role of vascular
356 endothelial growth factor and estradiol in the regulation of endometrial angiogenesis
357 and cell proliferation in the marmoset. *Endocrinology*, v.149, n.9, p.4413-4420, 2008.
- 358 **Freitas PRC, Coelho SG, Rabelo E, Lana AMQ, Artunduaga MAT, Saturnino H M.**
359 Artificial induction of lactation in cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, n.10,
360 p.2268-2272, 2010.
- 361 **Freitas PRC, Coelho SG, Rabelo E, Lana ÂMQ, Artunduaga MAT, Saturnino HM.**
362 Artificial induction of lactation in cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, n.39, n.10,
363 p.2268-2272, 2010.
- 364 **Jewell T.** Artificial induction of lactation in non breeder dairy cows. Virginia Polytechnic
365 Institute and State University, 2002.
- 366 **Kasimanickam R, Duffield T, Foster R, Gartley C, Leslie K, Walton J, Johnson W.**
367 Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical
368 endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, v.62, n.1-2, p.9-23, 2004.
- 369 **Katagiri S, Moriyoshi M.** Alteration of the endometrial EGF profile as a potential
370 mechanism connecting the alterations in the ovarian steroid hormone profile to

- 371 embryonic loss in repeat breeders and high-producing cows. *Journal of Reproduction*
372 *and Development*, v.59, n.5, p.415-420, 2013.
- 373 **Madsen CA, Perry GA, Mogck CL, Daly RF, MacNeil MD, Geary TW.** Effects of
374 preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows.
375 *Animal Reproduction Science*, v.158, p.96-103, 2015.
- 376 **Mann, G.** Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. *Animal*
377 *Reproduction Science*, v.115, n.1, p.296-299, 2009.
- 378 **Mann G, Fray M, Lamming G.** Effects of time of progesterone supplementation on embryo
379 development and interferon- τ production in the cow. *The Veterinary Journal*, v.171,
380 n.3, p.500-503, 2006.
- 381 **Mellado J, Sepulveda E, Garcia JE, Rodriguez A, De Santiago MA, Veliz FG, Mellado**
382 **M.** Milk yield of Holstein cows induced into lactation twice consecutively and
383 lactation curve models fitted to artificial lactations. *Journal of Integrative Agriculture*,
384 v.13, n.6, p.1349-1354, 2014.
- 385 **Mellado M, Antonio-Chirino E, Meza-Herrera C, Veliz FG, Arevalo JR, Mellado J, de**
386 **Santiago A.** Effect of lactation number, year, and season of initiation of lactation on
387 milk yield of cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant
388 bovine somatotropin. *J Dairy Sci*, v.94, n.9, p.4524-4530, 2011.
- 389 **Padua MB, Hansen PJ.** Evolution and function of the uterine serpins (SERPINA14).
390 *American Journal of Reproductive Immunology*, v.64, n.4, p.265-274, 2010.
- 391 **Pestano H, Haas C, Santos M, Oliveira F, Gasperin B.** Indução artificial de lactação em
392 bovinos: histórico e evolução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.39, n.3,
393 p.315-321, 2017.

- 394 **Rawy M, Mido S, Ali HE, Derar D, Megahed G, Kitahara G, Osawa T.** Effect of
395 exogenous estradiol Benzoate on uterine blood flow in postpartum dairy cows. *Animal*
396 *Reproduction Science*, v.192, p.136-145, 2018.
- 397 **Sangsitavong S, Combs D, Sartori R, Armentano L, Wiltbank M.** High feed intake
398 increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy
399 cattle. *J Dairy Sci*, v.85, n.11, p.2831-2842, 2002.
- 400 **Sicsic R, Goshen T, Dutta R, Kedem-Vaanunu N, Kaplan-Shabtai V, Pasternak Z, Raz**
401 **T.** Microbial communities and inflammatory response in the endometrium differ
402 between normal and metritic dairy cows at 5–10 days post-partum. *Veterinary*
403 *research*, v.49, n.1, p.77, 2018.
- 404 **Smith KL, Schanbacher FL.** Hormone Induced Lactation in the Bovine. I. Lactational
405 Performance Following Injections of 17 β -Estradiol and Progesterone1. *J Dairy Sci*,
406 v.56, n.6, p.738-743, 1973.
- 407 **Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Palmarini M.** Pregnancy
408 recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone,
409 interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, Fertility and Development*,
410 v.19, n.1, p.65-78, 2006.
- 411 **Van Schyndel S, Pascottini OB, LeBlanc S.** Comparison of cow-side diagnostic techniques
412 for subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, v.120, p.117-122, 2018.
- 413 **Vynckier L, Debackere M, Kruif Ad, Coryn M.** Plasma estradiol-17 β concentrations in the
414 cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 β benzoate and
415 estradiol-17 β cypionate-a preliminary study. *Journal of veterinary pharmacology and*
416 *therapeutics*, v.13, n.1, p.36-42, 1990.
- 417
- 418

419 **Tabelas**

420 Tabela 1. Genes e sequências de iniciadores

Gene ID	Forward	Reverse
<i>AQP4</i>	GTGTCTGTTGCAGTGAGAT	CAAAGGGACCTGGGATTTAG
<i>CCND1</i>	AACTACCTGGACCGCTT	AGTGTAATGCACAGCTTCT
<i>Ciclofilina</i>	GGTCATCGGTCTCTTTGGAA	TCCTTGATCACACGATGGAA
<i>COL4A1</i>	CACGGCTACTCTTTGCTCTAC	GAAGGGCATGGTACTGAACTT
<i>EGFR</i>	CCGTGAGTTGATCCTTGAATTCTC	GTCCGTAGGGCTTGGCAAAT
<i>ESR1</i>	CAGGCACATGAGCAACAAAG	TCCAGCAGCAGGTCGTAGAG
<i>ESR2</i>	CAGCCGTCAGTTCTGTATGCA	TCCTTTTCAATGTCTCCCTGTTC
<i>GAPDH</i>	GATTGTCAGCAATGCCTCCT	GGTCATAAGTCCCTCCACGA
<i>GREB1</i>	CACCTGCGTGCACAAGTTAC	GCTGGAATCCGCGATTGAAC
<i>OXTR</i>	GTCAGCAACGTCAAGCTCATCT	AGACACTCCACATCTGCACGAA
<i>PGR</i>	GCCGCAGGTCTACCAGCCCTA	GTTATGCTGTCCTTCCATTGCCCTT
<i>PGRMC1</i>	AGGGGCCGTATGGAGTCTTT	CCACATGATGGTACTTGAAAGTGAA
<i>PGRMC2</i>	CAGGGGAAGAACCCTCAGAA	ATGAAGCCCCACCAGACATT
<i>PTCH2</i>	CATCCTGCTGCTGTGTACTT	ATCGCCAGGACCAGTACTAT
<i>SERPINA14</i>	ATATCATCTTCTCCCCATGG	GTGCACATCCAACAGTTTGG
<i>SLC2A1</i>	ATCATCTTCACCGTGCTCCTGGTT	TGTCACCTTGACTTGCTCCTCCCT

421

Tabela 2. Número de células avaliadas por citologia endometrial antes e depois da exposição a estrógenos (média \pm erro padrão)

	Células observadas				
	TI (%)	TII (%)	TIII (%)	N (%)	L (%)
Antes	73,0 \pm 5,1	17,3 \pm 5,3	5,8 \pm 2,8	3,0 \pm 2,2	0,8 \pm 0,5
Depois	72,8 \pm 4,8	19,8 \pm 4,9	1,0 \pm 0,4	2,6 \pm 1,3	3,6 \pm 1,9

422

423 Células superficiais (TI), células intermediárias (TII), células basais (TIII), neutrófilos (N) e

424 linfócitos (L)

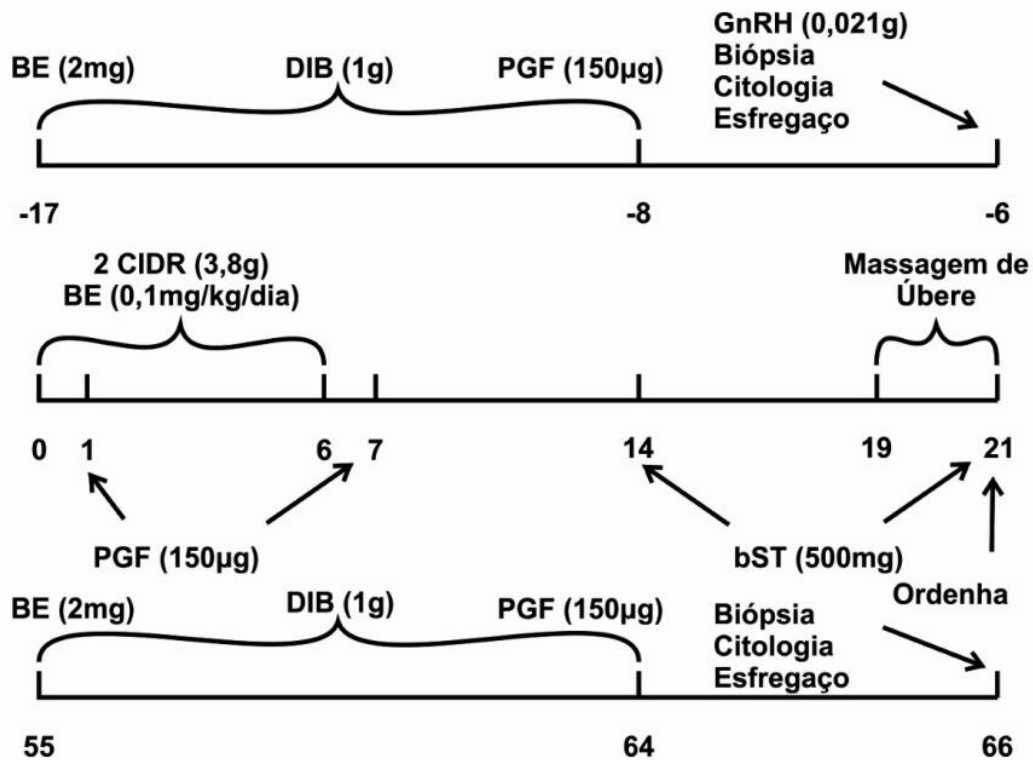
425

426

427

428

429 Figuras



430

431 Figura 1: Desenho experimental do experimento 1. Protocolo de pré-sincronização (D-17 a D-
 432 6) e coleta de amostras de endométrio de vacas no proestro (D-6) antes da exposição a
 433 estrógenos; Protocolo de indução da lactação (D0 a D21); Protocolo de nova sincronização
 434 (D55 a D66) para coleta de amostras de endométrio no proestro (D66) pós-exposição ao
 435 protocolo de indução.

436 *BE- Benzoato de estradiol (Gonadiol[®] - Zoetis, São Paulo, Brasil);

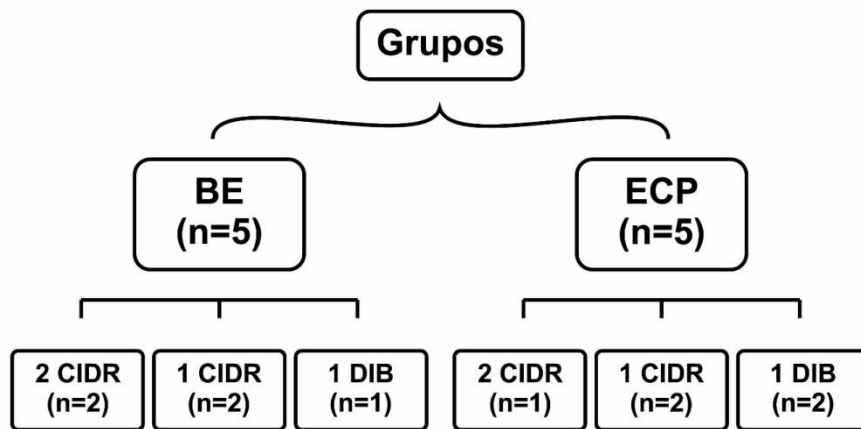
437 *DIB- DIV de 1g de P4 (DIB[®] - Zoetis, São Paulo, Brasil);

438 *PGF- Cloprostenol sódico (Prolise[®] - Tecnopec Ltda, São Paulo, Brasil);

439 *GnRH- Hormônio liberador de gonadotrofina (Gonaxal[®] Biogénesis Bagó, Paraná, Brasil);

440 *CIDR- DIV de 1,9g de P4 CIDR[®] - Zoetis, São Paulo, Brasil;

441 *bST- Somatotropina bovina recombinante (Boostin[®]- MSD Saúde Animal, São Paulo,
 442 Brasil).



443 1.

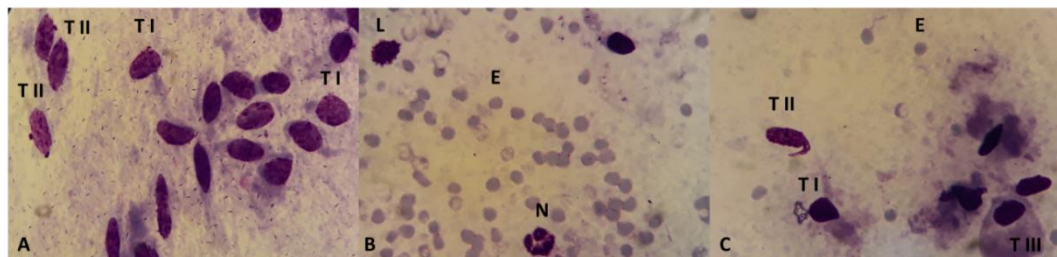
444 Figura 2. Desenho experimental do experimento 2 conforme os tratamentos de sais de
445 estradiol e progesterona.

446 *BE- Benzoato de estradiol (Gonadiol[®] - Zoetis, São Paulo, Brasil);

447 *ECP- Cipionato de estradiol (ECP[®] - Zoetis, São Paulo, Brasil)

448 *DIB- DIV de 1g de P4 (DIB[®] - Zoetis, São Paulo, Brasil);

449 *CIDR- DIV de 1,9g de P4 CIDR[®] - Zoetis, São Paulo, Brasil;

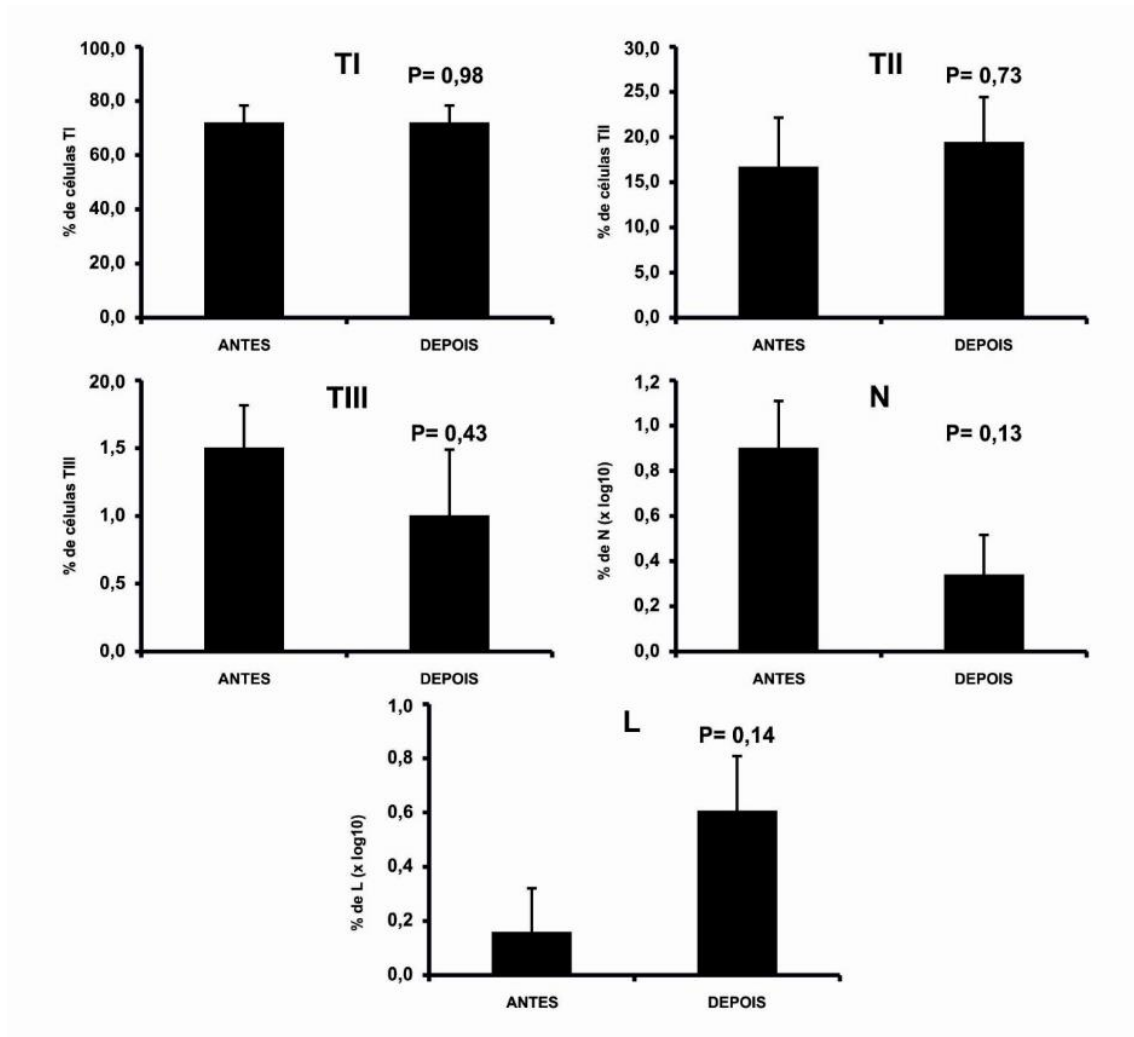


450

451 Figura 3: Padrão celular encontrado na citologia uterina. Células superficiais (TI) em A e C,

452 células intermediárias (TII) em A e C, células basais (TIII) em C, neutrófilos (N) e linfócitos

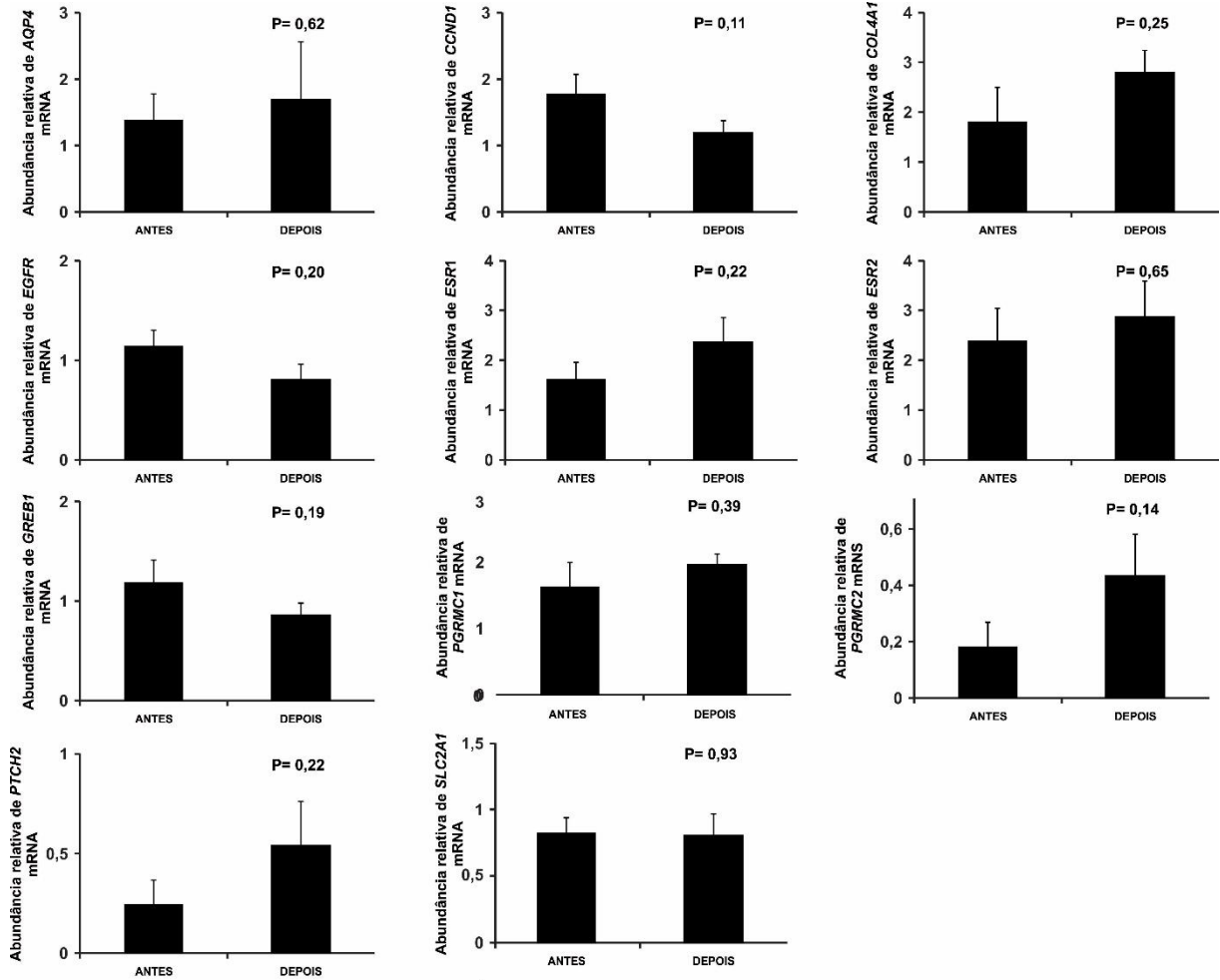
453 (L) e eritrócitos (E) em B.



454

455 Figura 4: Porcentagem de células avaliadas no esfregaço feito a partir da citologia uterina nas
 456 vacas antes (D-6) e após tratamento (D66). Nos dois momentos as células foram coletadas no
 457 proestro.

458 Células superficiais (TI), células intermediárias (TII), células basais (TIII), neutrófilos (N) e
 459 linfócitos (L) ($p > 0,05$).

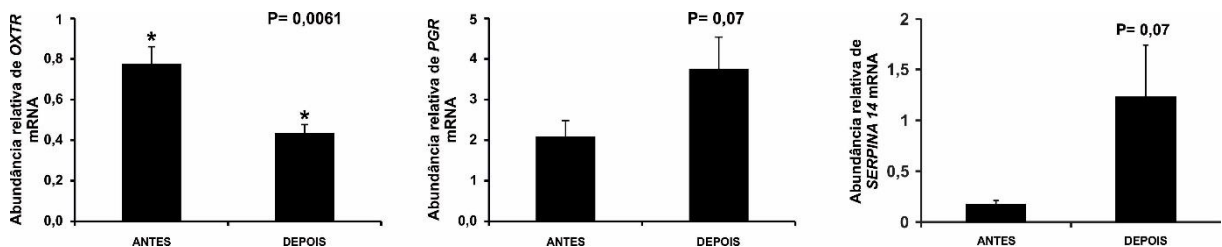


460

461

462 Figura 5: Abundância relativa de RNAm das células endometriais coletadas por biopsia de
 463 vacas no proestro antes e depois da exposição aos estrógenos ($p > 0,05$).

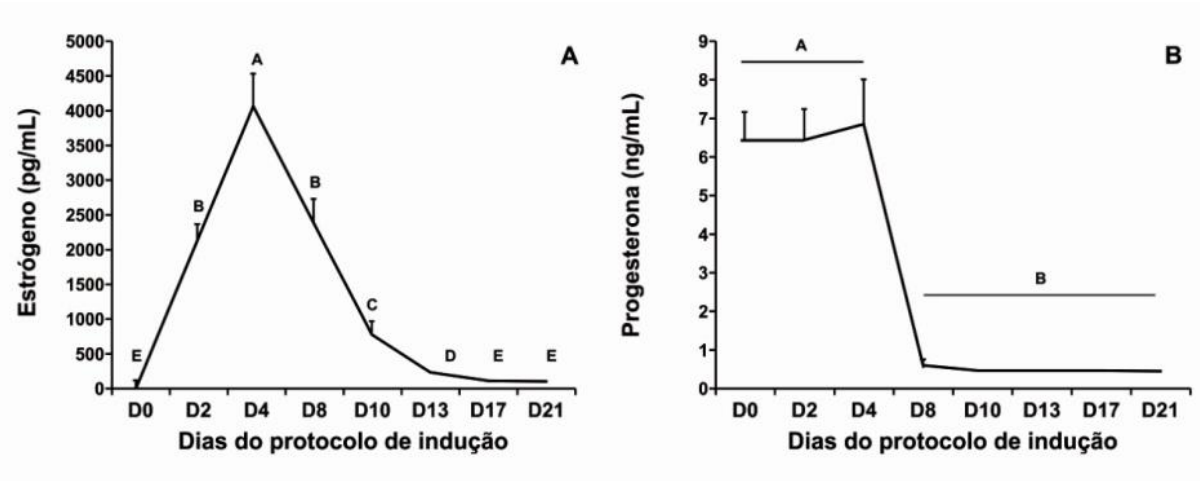
464



465

466 Figura 6: Abundância relativa de RNAm das células endometriais coletadas por biopsia de
 467 vacas no proestro antes e depois da exposição aos estrógenos.

468 * Indica diferença estatística entre os momentos ($p < 0,05$).

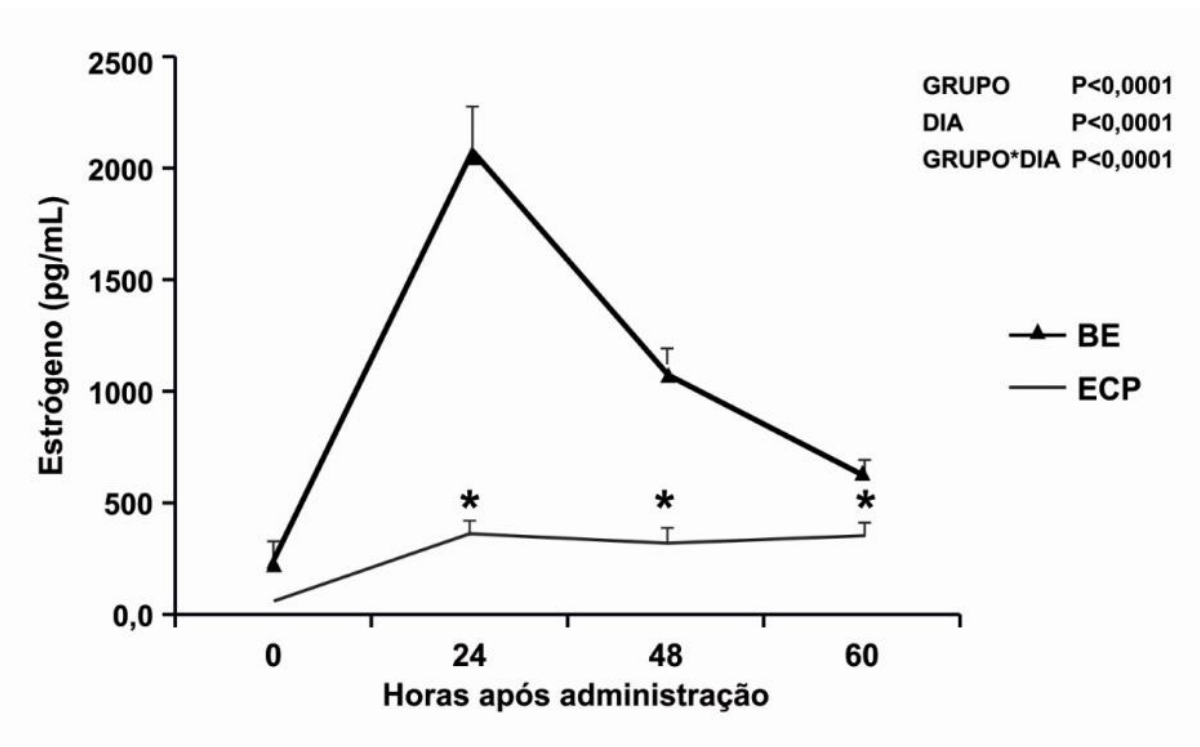


469

470 Figura 7: Níveis de estrógeno (A) e progesterona (B) em vacas submetidas a indução artificial
471 da lactação.

472 *Letras diferentes nos gráficos indicam diferença estatística entre os dias ($p < 0,05$).

473



474

475 Figura 8: Níveis de Estrógeno das vacas do experimento II. * Indica diferença estatística entre
476 os grupos ($p < 0,05$).

4 Considerações Finais

Em resumo, se avaliou a utilização da técnica de IAIF em bovinos e também as alterações promovidas pela prolongada exposição a estrógenos no perfil endócrino, na expressão gênica e no padrão das células do endométrio das vacas expostas aos protocolos de IAL.

Inicialmente, observou-se que os espermatozoides incubados em FF ou em ambiente folicular apresentaram uma baixa motilidade pós incubação, evidenciando que o FF e o ambiente folicular são prejudiciais aos espermatozoides. Portanto, a utilização da IAIF em bovinos ainda precisa ser melhor esclarecida para que a técnica possa, de fato, auxiliar em casos de vacas com infertilidade.

Em um segundo momento, observou-se que animais expostos a prolongada exposição a estrógenos atingiram níveis elevados de progesterona (6 ng/ml) e estradiol (4.000 pg/ml), voltando a níveis basais após o término das aplicações exógenas. A modulação gênica exercida sugere que a prolongada exposição a estrógenos influencia o ambiente uterino de vacas submetidas a protocolos de IAL, com efeitos positivos sobre sua fertilidade subsequente, uma vez que 66,66% das vacas gestaram após o protocolo. Entretanto, a prolongada exposição a estrógenos não foi capaz de induzir modificações no padrão celular do endométrio de vacas no proestro depois do tratamento, indicando que provavelmente não seja através destas modulações os eventos envolvidos na retomada da fertilidade.

Estes dados fornecem subsídio para estudos futuros que objetivem avaliar problemas de infertilidade em bovinos, especialmente bovinos leiteiros os quais estes problemas impactam diretamente na lucratividade da atividade.

Referências

AL-EKNAH, M.; NOAKES, D. Uterine activity in cows during the oestrous cycle, after ovariectomy and following exogenous oestradiol and progesterone. **British Veterinary Journal**, v. 145, p. 328-336, 1989.

AMANN R; KATZ D.F. Reflections on CASA after 25 years. **J Androl**, v. 25, p.317-325, 2004.

AMBROSE, D.J.; GOBIKRUSHANTH, M.; ZUIDHOF, S.; KASTELIC, J.P. Low-dose natural prostaglandin F2 α (dinoprost) at timed insemination improves conception rate in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 83, n.4, p. 529-534, 2015.

ARAÚJO, E.R.; SPONCHIADO, M.; PUGLIESI, G.; VAN HOECK, V.; MESQUITA, F.S.; MEMBRIVE, C.M.; BINELLI, M. Spatio-specific regulation of endocrine-responsive gene transcription by periovulatory endocrine profiles in the bovine reproductive tract. **Reproduction, Fertility and Development**, 2015.

BASTOS, Y.H.G.B.; FERREIRA, C.S.; GOMES, G.M.; JÚNIOR, K.D.C.P.; DE MACEDO GOMES, L.P.; PAPA, F.O.; CRESPILO, A.M. Avaliação de diferentes técnicas de coloração para esfregaços obtidos por punção biópsia aspirativa testicular de bovinos. **Revista de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 05-10, 2015.

BAZER, F.W.; WU, G.; SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; BAYLESS, K. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v.16, n.3, p. 135-152, 2009.

BERRY, D.P.; WALL, E.; PRYCE, J. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. **Animal**, v. 8, p. 105-121, 2014.

BINELLI, M.; PUGLIESI, G.; HOECK, V.; SPONCHIADO, M.; RAMOS, R.; OLIVEIRA, M.; FRANÇA, M.; D'ALEXANDRI, F.; MESQUITA, F.; MEMBRIVE, C. The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. **Animal Reproduction**, p. 246-253, 2014.

BISHOP, C. V. Progesterone inhibition of oxytocin signaling in endometrium. **Frontiers in neuroscience**, v. 7, p. 138, 2013.

BOSSAERT, P.; LEROY, J.; DE VLIEGHER, S.; OPSOMER, G. Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 91, n. 9, p. 3363-3371, 2008.

BRODZKI, P.; BRODZKI, A.; KUREK, Ł.; MARCZUK, J.; TATARA, M. R. Endometrial cytology at luteal and follicular phases of the ovarian cycle in cows. **Annals of Animal Science**, v. 15, n. 1, p.107-117, 2015.

CHACIN, M.L.; HANSEN, P.; DROST, M. Effects of stage of the estrous cycle and steroid treatment on uterine immunoglobulin content and polymorphonuclear leukocytes in cattle. **Theriogenology**, v. 34, p. 1169-1184, 1990.

CHAKRIYARAT, S.; HEAD, H.; THATCHER, W.; NEAL, F.; WILCOX, C. Induction of Lactation: Lactational, Physiological, and Hormonal Responses in the Bovine¹. **J Dairy Sci**, v. 61, n. 12, p. 1715-1724, 1978.

ČIKOŠ, Š.; BUKOVSKÁ, A.; KOPPEL, J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. **BMC molecular biology**, v. 8, n.1, p. 113, 2007.

COLAZO, M.; BEHROUZI, A.; AMBROSE, D.; MAPLETOFT, R. 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**, v. 84, p.377-383, 2015.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen de animal, 3ed. Belo Horizonte: **CBRA**; 2013.

COOK, R. World Cattle Inventory: Ranking of Countries (Obtido de Beef2Life: <http://beef2live.com/story-world-cattle-inventory-ranking-countries-0-106905>), 2016.

DE RENSIS, F.; LOPEZ-GATIUS, F.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; MORINI, G.; SCARAMUZZI, R. Causes of declining fertility in dairy cows during the warm season. **Theriogenology**, v. 91, p. 145-153, 2017.

EILTS, B.; PINTO, C.; PACCAMONTI, D.; NIEMANSTVERDREIT, A.; GARCIA, E.; GODKE, R. Transvaginal intrafollicular sperm cell injection with concomitant artificial insemination in the cyclic mare. **Theriogenology**, v. 58, p. 631-633, 2002.

EILTS, B.E.; LYLE, S.K.; BORKHSENIUS, O.N.; HENK, W.G.; PACCAMONTI, D.L.; FERRER, M.S. Spermatozoal binding and phagocytosis by granulosa cells after intrafollicular insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 326-330, 2006.

FORDE, N.; BELTMAN, M.E.; DUFFY, G.; DUFFY, P.; MEHTA, J.; Ó'GAORA, P.; ROCHE, J.; LONERGAN, P.; CROWE, M. 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, p.266-278, 2011.

FORDE, N.; MEHTA, J.P.; MINTEN, M.; CROWE, M.A.; ROCHE, J.F.; SPENCER, T.E.; LONERGAN, P. Effects of low progesterone on the endometrial transcriptome in cattle. **Biology of reproduction**, v. 87, p. 124, 2012.

FRASER, H.M.; WILSON, H.; SILVESTRI, A.; MORRIS, K.D.; WIEGAND, S.J. The role of vascular endothelial growth factor and estradiol in the regulation of endometrial angiogenesis and cell proliferation in the marmoset. **Endocrinology**, v.149, n. 9, p. 4413-4420, 2008.

FREITAS, P.R.C.; COELHO, S.G.; RABELO, E.; LANA, A.M. Q.; ARTUNDUAGA, M.A.T.; SATURNINO, H.M. Artificial induction of lactation in cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 10, p. 2268-2272, 2010.

GALLI, C.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. **Theriogenology** v.81, p. 138-151, 2014.

GASPERIN, B.G.; FERREIRA, R.; ROVANI, M.T.; SANTOS, J.; BURATINI, J.; PRICE, C.A.; GONÇALVES, P.B.D. FGF10 inhibits dominant follicle growth and estradiol secretion in vivo in cattle. **Reproduction**, v.143, p.815-823, 2012.

GETPOOK, C.; WIROTKARUN, S. Sperm motility stimulation and preservation with various concentrations of follicular fluid. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 24, p. 425-42, 2007.

HAMDI, S. M.; VIEITEZ, G.; JASPARD, B.; BARBARAS, R.; PERRET, B.; MIEUSSET, R.; PARINAUD., J.; COLLET, X. Effects of human follicular fluid and high-density lipoproteins on early spermatozoa hyperactivation and cholesterol efflux. **Journal of Lipid Research**, v.51, p.1363-1369, 2010.

HUSSEIN, A.; NEWBY, T.; BOURNE, F. Immunohistochemical studies of the local immune system in the reproductive tract of the sow. **Journal of reproductive immunology**, v. 5, p. 1-15, 1983.

JEWELL, T. Artificial induction of lactation in nonbreeder dairy cows. **Virginia Polytechnic Institute and State University**, 2002.

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T.; FOSTER, R.; GARTLEY, C.; LESLIE, K.; WALTON, J.; JOHNSON, W. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 9-23, 2004.

KATAGIRI, S; MORIYOSHI, M. Alteration of the endometrial EGF profile as a potential mechanism connecting the alterations in the ovarian steroid hormone profile to embryonic loss in repeat breeders and high-producing cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, n. 5, p. 415-420, 2013.

KATAGIRI, S.; MOON, Y.S.; YUEN, B.H. The role for the uterine insulin-like growth factor I in early embryonic loss after superovulation in the rat. **Fertility and sterility**, v. 65, p. 426-436, 1996.

KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Changes in EGF concentrations during estrous cycle in bovine endometrium and their alterations in repeat breeder cows. **Theriogenology**, v. 62, p. 103-112, 2004.

KIM, E.Y.; NOH, E.H.; NOH, E.J.; PARK, M.J.; PARK, H.I.; LEE, D.S.; RIU, K.Z.; PARK, S.P. Effect of Glycosaminoglycans on In vitro Fertilizing Ability and In vitro Developmental Potential of Bovine Embryos. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v.26, p.178-188, 2013.

LEÃO, K.; ALVARENGA, M.; PUOLLI-FILHO, J. Factors involved in failure of transvaginal intrafollicular insemination in mares. **Equine Embryo Transfer**, v.64, 2005.

- LEEMANS, B.; GADELLA, B.M.; STOUT, T.A.; NELIS, H.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. An alkaline follicular fluid fraction induces capacitation and limited release of oviduct epithelium-bound stallion sperm. **Reproduction**, v. 150, p.193-208, 2015.
- LÓPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R.H.F. Intrafollicular insemination for the treatment of infertility in the dairy cow. **Theriogenology**, v. 75, p. 1695-1698, 2011.
- LUCCHINI, C.; VOLPE, E.; TOCCI, A. Comparison of intrafollicular sperm injection and intrauterine insemination in the treatment of subfertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.29, p.1103-1109, 2012.
- LUCENA, E.; RUIZ, J.; MENDOZA, J.; LUCENA, A.; LUCENA, C.; ARANGO, A. Direct intrafollicular insemination. A case report. **The Journal of reproductive medicine**, v. 36, p. 525-526, 1991.
- MADSEN, C.A.; PERRY, G.A.; MOGCK, C.L.; DALY, R.F.; MACNEIL, M.D.; GEARY, T.W. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. **Animal reproduction science**, v. 158, p. 96-103, 2015.
- MAGLIARO, A.; KENSINGER, R.; FORD, S.; O'CONNOR, M.; MULLER, L.; GRABOSKI, R. Induced lactation in nonpregnant cows: Profitability and response to bovine somatotropin. **Journal of dairy science**, v. 87, p. 3290-3297, 2004.
- MANN, G. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. **Animal Reproduction Science**, v. 115, n. 1, p. 296-299, 2009.
- MANN, G.; FRAY, M.; LAMMING, G. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. **The Veterinary Journal**, v. 171, n. 3, p. 500-503, 2006.
- MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literature. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.
- MEINJTES, M.; EILTS, B.; COCHRAN, R.; GRAFF, K.; DENNISTRON, R.; PACCAMONTI, D.; GODKE, R. Transvaginal intrafollicular sperm cell injection in the cyclic mare. In: 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, p. 39-40, 2001.

MELLADO, J.; SEPULVEDA, E.; GARCIA, J. E.; RODRIGUEZ, A.; DE SANTIAGO, M. A.; VELIZ, F. G.; MELLADO, M. Milk yield of Holstein cows induced into lactation twice consecutively and lactation curve models fitted to artificial lactations. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, n. 6, p. 1349-1354, 2014.

MELLADO, M.; ANTONIO-CHIRINO, E.; MEZA-HERRERA, C.; VELIZ, F.G.; AREVALO, J.R.; MELLADO, J.; DE SANTIAGO, A. Effect of lactation number, year, and season of initiation of lactation on milk yield of cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin. **J Dairy Sci**, v. 94, n. 9, p. 4524-4530, 2011.

NUOJUA-HUTTUNEN, S.; TUOMIVAARA, L.; JUNTUNEN, K.; TOMÁS, C., KAUPPILA, A.; MARTIKAINEN, H. Intrafollicular insemination for the treatment of infertility. **Human Reproduction**, v. 10, p. 91-93, 1995.

PADUA, M. B.; HANSEN, P. J. Evolution and function of the uterine serpins (SERPINA14). **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 64, n. 4, p. 265-274, 2010.

PARLEVLIET, J.; LYNN, J.; EILTS, B.; LYLE, S.; FERRER, M.; ALJARRAH, A.; PACCAMONTI, D. Failure of embryo development after intrafollicular insemination in the horse: due to the sperm viability? **Equine embryo transfer**, v. 61, 2005.

PERRY, G.; SMITH, M.; ROBERTS, A.; MACNEIL, M.; GEARY, T. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 85, p. 684-689, 2007.

PERRY, G.A.; SMITH, M.F.; LUCY, M.C.; GREEN, J.A.; PARKS, T.E.; MACNEIL, M.D.; ROBERTS, A.J.; GEARY, T.W. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 5268-5273, 2005.

PESTANO, H.; HAAS, C.; SANTOS, M.; OLIVEIRA, F.; GASPERIN, B. Indução artificial de lactação em bovinos: histórico e evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 3, p. 315-321, 2017.

PIJNENBORG, R.; GORDTS, S.; ONGKOWIDJOJO, R.; BROSENS, I. Sperm phagocytosis by corona cells in a human in vitro fertilization system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 442, p. 310-317, 1985.

RAWY, M.; MIDO, S.; ALI, H.E.S.; DERAR, D.; MEGAHEDE, G.; KITAHARA, G.; OSAWA, T. Effect of exogenous estradiol Benzoate on uterine blood flow in postpartum dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.192, p.136-145, 2018.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L.; WILTBANK, M. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. **J Dairy Sci**, v.85, n.11, p.2831-2842, 2002.

SANTOS, J.; NARCISO, C.; RIVERA, F.; THATCHER, W.; CHEBEL, R. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. **Journal of dairy science**, v.93, p.2976-2988, 2010.

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

SEGERSON, E.; LIBBY, D.; GETZ, W.; RANDEL, R. Immunosuppressive effect of uterine secretory protein from Angus and Brahman cows upon lymphocytes in vitro. **Journal of animal science**, v.59, p.1047-1059, 1984.

SICSIC, R.; GOSHEN, T.; DUTTA, R.; KEDEM-VAANUNU, N.; KAPLAN-SHABTAI, V.; PASTERNAK, Z.; RAZ, T. Microbial communities and inflammatory response in the endometrium differ between normal and metritic dairy cows at 5–10 days postpartum. **Veterinary research**, v.49, n.1, p.77, 2018.

SMITH, K.L.; SCHANBACHER, F.L. Hormone Induced Lactation in the Bovine. I. Lactational Performance Following Injections of 17 β -Estradiol and Progesterone¹. **J Dairy Sci**, v.56, n.6, p.738-743, 1973.

SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W.; BURGHARDT, R. C.; PALMARINI, M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, n.1, p.65-78, 2006.

TOCCI, A.; LUCCHINI C. Feasibility and results of a modified intrafollicular insemination technique for treating primary infertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.28, p.821-824, 2011.

TUCKER, H.A. Quantitative estimates of mammary growth during various physiological states: a review. **Journal of dairy science**, v.70, p.1958-1966, 1987.

VAN SCHYNDEL, S.; PASCOTTINI, O.B.; LEBLANC, S. Comparison of cow-side diagnostic techniques for subclinical endometritis in dairy cows. **Theriogenology**, v. 120, p.117-122, 2018.

VASCONCELOS, J.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H.; GUENTHER, J.; WILTBANK, M. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v.56, p.307-314, 2001.

VYNCKIER, L.; DEBACKERE, M.; KRUIF, A. D.; 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, n.1, p.36-42, 1990.

WALKER, S.M.; STANLEY, A.J. Effect of diethylstilbestrol dipropionate on mammary development and lactation. **Experimental Biology and Medicine**, v. 48, p. 50-53, 1941.

WIRA, C.R.; SANDOE, C.P. Sex steroid hormone regulation of IgA and IgG in rat uterine secretions. **Nature**, v. 268, p. 534-536, 1977.

ZBELLA, E.A.; TARANTINO, S.; WADE, R. Intrafollicular insemination for male factor infertility. **Fertility and sterility** v.58, p.442-443, 1992.

Anexos

Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal (Artigo 1)



Pelotas, 10 de dezembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA)

Para: Prof. Thomaz Lucia Jr

Departamento de Patologia Animal – Faculdade de Veterinária

Senhor Professor:

A *CEEAA* analisou o projeto intitulado: **“Inseminação intrafolicular em bovinos”**, processo nº23110.008440/2015-58, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata. Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEAA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEAA 8440-2015**).

Vigência do Projeto: 15/01/2016 a 15/01/2019

Espécie/Linhagem: Bovina/SRD

Nº de animais: 40

Idade: 2-12 anos

Sexo: Fêmeas

Origem: Centro Agropecuário da Palma - UFPel

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEAA

Assinatura do Professor Responsável:

Assinatura em: 16/12/2015

Anexo II - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal (Artigo 2)



Pelotas, 12 de setembro de 2016

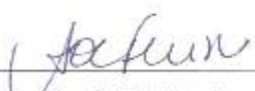
Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Modulação gênica, endócrina e celular em vacas submetidas à prolongada exposição a estrógeno**”, registrada sob o nº 23110.007347/2016-15, sob a responsabilidade de **Thomaz Lucia Júnior** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 05/09/2016.

Finalidade	(X) Pesquisa	() Ensino
Vigência da autorização	13/09/2016 a 01/03/2019	
Espécie/linhagem/raça	Bovina/ Holandês, Jersey e SRD	
Nº de animais	40	
Idade	3-8 anos	
Sexo	Fêmeas	
Origem	Centro Agropecuário da Palma – UFPel e Propriedades Comerciais da região de Pelotas/RS	

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao **COBALTO** para posterior registro no **COCEPE** (código para cadastro nº **CELA 7347-2016**).


M.V. Dra. **Anelize de Oliveira Campello Felix**
Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável:


Ciente em: 30/09/2016

Anexo III - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal (Artigo 2)



Pelotas, 14 de janeiro de 2015

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Professor Bernardo Garziera Gasperin

Faculdade de Veterinária

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto de extensão intitulado: **“Indução da lactação em fêmeas bovinas: avaliação do perfil endócrino e de marcadores de resposta inflamatória”**, processo nº23110.010524/2014-71, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 10524-2014).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Ciente em: 015 / 01 / 2015

Assinatura do Professor Responsável: