UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(CLÍNICA E REPRODUÇÃO ANIMAL)

LUANA RANGEL CÔRTES

EFEITO DA GONADOTROPINA CORIÔNICA HUMANA SETE DIAS APÓS O ESTRO NA FORMAÇÃO DE CORPO LÚTEO ACESSÓRIO E GESTAÇÃO EM CABRAS LEITEIRAS

NITERÓI
2019

LUANA RANGEL CÔRTES

EFEITO DA GONADOTROPINA CORIÔNICA HUMANA SETE DIAS APÓS O ESTRO NA FORMAÇÃO DE CORPO LÚTEO ACESSÓRIO E GESTAÇÃO EM CABRAS LEITEIRAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal) da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para aprovação a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientadora:

Profª. Drª. Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan

Coorientadores:

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão

Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca

NITERÓI, RJ

2019

LUANA RANGEL CÔRTES

EFEITO DA GONADOTROPINA CORIÔNICA HUMANA SETE DIAS APÓS O ESTRO NA FORMAÇÃO DE CORPO LÚTEO ACESSÓRIO E GESTAÇÃO EM CABRAS LEITEIRAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal) da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para aprovação a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Drª. Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan – UFF

Orientadora

_____

Prof. Dr. André Luís Rios Rodrigues – UFF

_____

Prof. Dr. Ângelo José Burla Dias - UENF

Niterói

2019

Dedico à minha família e amigos,

por todo amor compartilhado.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFF pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

À Embrapa Caprinos e Ovinos, Embrapa Gado de Leite, ao CNPq e FAPEMIG pelo financiamento do projeto. À bolsa de mestrado cedida pelo CNPq.

À minha orientadora, Profª. Drª. Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan, por ter ido muito além da sua função de me orientar. Jô, você é um ser de luz que veio para a terra com a missão de iluminar as nossas vidas. Óbvio que existem outras missões também, mas essa eu estou sentindo na pele desde que te conheci. Nunca esqueço da primeira aula que assisti sua na graduação que fez com que eu escolhesse o caminho que seguiria na minha vida. Você é um exemplo de mulher a ser seguido, daquelas que não dá para colocar defeito. E além de tudo, é, junto dos doutores Jeferson e Rodolfo Ungerfeld, meu maior exemplo na pesquisa. Foi com você que aprendi a amar a pesquisa e a reprodução. Muito obrigada por isso! Mas muito além de tudo já mencionado, você é uma das melhores pessoas que já entraram na minha vida e eu te peço que permaneça para sempre! Você esteve do meu lado nos piores e mais difíceis momentos da minha vida, segurando essa barra junto comigo, dividindo o peso dela e não me deixando desistir. Se não fosse você, literalmente, eu não estaria terminando esse mestrado. Você foi fundamental durante esses dois anos, assim como foi fundamental na minha graduação e é fundamental na minha vida! E se antes eu pensava que eu era uma mulher azarada, hoje eu sei que sou uma mulher de muita sorte, pois te tenho ao meu lado! Obrigada por todo apoio e dedicação. Te amo!

Ao meu coorientador, Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca, por ter aceitado essa missão. É tanta gratidão que tenho por ti, que chega a ser difícil tentar explicar. Obrigada por todos os ensinamentos técnicos da nossa profissão, que foram passados com tanta maestria. É simplesmente incrível te ver trabalhar com tanto amor e dedicação. Você é um pesquisador genial e eu espero um dia conseguir chegar perto disso. Só que muito além do que aprender sobre profissão, você me ensinou sobre a vida, me mostrando que sou capaz de tudo, desde montar prateleiras e dirigir, até conduzir um experimento. Aprendi que devo levar as coisas

de forma mais tranquila, observar mais e falar um pouco menos também. O valor de família que eu já tinha, só aumentou ao poder conviver com a sua. Que união linda! Eram os momentos que eu me sentia em casa. E a alegria da chegada do João Paulo? Só de escrever sobre já me emociono. Enfim, muito obrigada por tudo e espero poder continuar seguindo ao seu lado na pesquisa e na vida!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão, por ter me aceitado no programa e ter realizado minhas dosagens de progesterona. Muito obrigada!

Ao Dr. Eduardo Kenji Nunes Arashiro, pela disponibilidade e paciência em realizar a estatística do estudo. Muito obrigada de verdade, você foi fundamental!

À equipe do setor de caprinos e ovinos, que tornaram a realização do meu experimento possível. Sem vocês nada disso seria possível. Cada um foi fundamental na minha caminhada até aqui. Muito obrigada, Ana, Aline, Lucas, Gisele, Jader, Dafne, Isabela, Luis, Brenda, Maíra e Thais. Vocês foram incríveis!

À Granja Água Limpa, por me permitir realizar o experimento. Muito obrigada por toda ajuda, doces, abraços e sorrisos, Sr. Joaquim e Preta. Vocês são maravilhosos e sinto saudades!

Aos meus amigos conquistados dentro da academia, Gláucia, Vivian, Clara Vieira, Gabi, Clara Monteiro e Higor. Vocês foram um grande presente e sou muito feliz por ter cada um de vocês na minha vida e dentro do meu coração.

Às cabras por despertarem esse amor incondicional dentro do meu coração e serem seres vivos tão incríveis.

Aos meus pais e irmã, por todo o amor, dedicação, confiança e por me apoiarem em todas as minhas decisões. Sei que não foi fácil para vocês vivenciarem todos esses momentos comigo, mas lá estavam vocês, sempre do meu lado, sendo meu alicerce. Vocês são pessoas incríveis! Temos nossos defeitos, mas também temos tanto tanto tanto amor, que conseguimos superar tudo!

A todos os Deuses, Deusas e Orixás, por toda energia a mim doada e por serem meu acalanto em cada contato que tenho com a natureza e com o meu interior.

Quando uma mulher escreve,

Quando uma mulher negra escreve,

Quando ocupa seu espaço de fala,

Empodera a si e a outras,

Presentifica a ação.

Vânia Melo

RESUMO

Em caprinos, o folículo dominante atinge seu diâmetro máximo no sexto dia após ovulação ou sete dias após início do estro. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel da gonadotropina coriônica humana (hCG) no Dia 7 após o estro no corpo lúteo (CL) original, na formação do CL acessório (CLA), concentrações de progesterona sérica e taxa de gestação em cabras leiteiras. Um total de 96 cabras da raça Toggenburg receberam esponja intravaginal contendo 60 mg de acetato medroxiprogesterona por seis dias. Às 24 h antes da retirada da esponja, 200 UI de gonadotropina coriônica equina e 30 µg de d-cloprostenol i.m. foram administrados. Após a retirada da esponja, a detecção de estro e acasalamento natural foram realizados. Sete dias (D7) após o estro, as fêmeas receberam 1 mL de salina (grupo CONTROLE) ou 300 UI de hCG (grupo hCG) i.m. Exames ultrassonográficos foram efetuados nos dias sete, 13, 17 e 21 após o estro e a taxa de gestação foi verificada no D30. A taxa de resposta ao estro foi de 89,6% (86/96). A área de tecido luteal, vascularização luteal e diâmetro de tecido luteal não revelaram diferenças significativas entre os grupos. A taxa de formação do CLA foi de 46,5% (20/43) para as cabras do grupo hCG e 0% para o CONTROLE e todas as fêmeas que desenvolveram CLA tornaram-se gestantes. A taxa de gestação foi maior ($P<0,05$) nas cabras tratadas com hCG (90,7%; 39/43) do que nas do CONTROLE (74,4%; 32/43). Em conclusão, a administração de hCG no D7 após o estro afetou positivamente a taxa de gestação em caprinos leiteiros.

Palavras-chave: Concentrações de progesterona; Corpo lúteo acessório; Gonadotropina; Taxa de concepção; Ultrassonografia Doppler.

ABSTRACT

In goats, the dominant follicle reaches its maximum diameter in the sixth day after ovulation or seventh day after estrus onset. This study aimed to assess the role of exogeneous hCG on Day 7 after estrus on the ovulatory corpus luteum (CL), accessory CL (ACL) formation, serum progesterone concentrations and pregnancy rate in dairy goats. A total of 96 Toggenburg female goats received an intravaginal sponge containing 60 mg of medroxyprogesterone acetate for six days. Both 200 IU equine chorionic gonadotropin and 30 µg of d-cloprostenol i.m. were administered 24 h before sponge removal. After sponge removal, estrus detection and breeding were performed. Seven days (D7) after estrus, females received either 1 mL of saline (CONTROL group) or 300 IU human chorionic gonadotropin (hCG group) i.m. Ultrasound exams were performed on Day 7, 13, 17 and 21 after estrus and pregnancy rate was verified on D30. Estrus response rate was overall 89.6% (86/96). The area of luteal tissue, luteal vascularization and the luteal tissue diameter did not reveal important differences between both groups. The ACL formation rate was 46.5% (20/43) for hCG and 0% for CONTROL goats and all females that developed ACL became pregnant. Pregnancy rate was higher ($P<0.05$) in hCG-goats (90.7%; 39/43) than in CONTROL-goats (74.4%; 32/43). In conclusion, hCG administration on D7 after estrus positively affected the pregnancy rate in dairy goats.

Keywords: Accessory corpora lutea; Conception rate; Doppler ultrasonography; Gonadotropin; Progesterone concentration.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, p.16

2 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERAURA, p.18
2.1 IMPORTÂNCIA DA CAPRINOCULTURA, p.18
2.2 ESTACIONALIDADE REPRODUTIVA, p.18
2.3 CICLO ESTRAL, p.20
2.4 FORMAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E INVOLUÇÃO DO CORPO LÚTEO, p.21
2.5 FISIOLOGIA DA GESTAÇÃO, p.23
2.6 UTILIZAÇÃO DA hCG, p.25
2.7 USO DA ULTRASSONOGRAFIA, p.26

3 OBJETIVOS, p.29
3.1 OBJETIVO GERAL, p.29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p.29

4 MATERIAL E MÉTODOS, p.30
4.1 PERÍODO, LOCAL E ANIMAIS EXPERIMENTAIS, p.30
4.2 DESENHO DO ESTUDO, p.30
4.3 INDUÇÃO HORMONAL DO ESTRO SINCRONIZADO E ACASALAMENTO, p.31
4.4 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS, p.31
4.5 COLETAS DE SANGUE E DOSAGEM DE PROGESTERONA SÉRICA, p.32
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p.32

5 CAPÍTULO II – HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN (HCG) ON DAY 7 AFTER ESTRUS IMPROVE PREGNANCY RATE IN DAIRY GOATS. p.34

ABSTRACT, p.35
INTRODUCTION, p.36
MATERIALS AND METHODS, p.37
ETHICS AND ANIMAL CARE, p.37

LOCATION AND EXPERIMENTAL CONDITIONS, p.37
ANIMALS, TREATMENTS AND ESTRUS DETECTION, p.38
ULTRASONOGRAPHIC EVALUATION, p.38
SERUM PROGESTERONE CONCENTRATIONS (P4), p.39
VARIABLES AND STATISTICAL ANALYSIS, p.40
RESULTS, p.40
ESTRUS RESPONSE, p.40
ULTRASONOGRAPHIC EVALUATION AND PREGNANCY RATE, p.40
SERUM P4 CONCENTRATIONS, p.41
DISCUSSION, p.42
CONCLUSION, p.44
REFERENCES, p.45

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS, p.50

Referências Bibliográficas, p.51

ANEXO 1, p.58

LISTA DE TABELAS

TABLE 1- Serum progesterone concentrations (Mean ± S.E.M.) in dairy goats (CAP II) receiving either hCG or saline (CONTROL) on Day 7 (D7) after estrus

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACL	*Accessory corpus luteum* (corpo lúteo acessório)
BCS	*Body condition score* (Escore de condição corporal)
BW	*Body weight* (peso corporal)
CL	Corpo lúteo
CLA	Corpo lúteo acessório
cm²	Centímetro quadrado
CNPq	Conselho nacional de pesquisa
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4 (Receptor de quimiocina tipo 4 C-X-C)
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotropina coriônica equina
EL	Epitélio luminal
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESR1	Receptor de estrogênio
FAPEMIG	Fundação de amparo a pesquisa do estado de Minas Gerais
FAPERJ	Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
fd	Frequência Doppler
FGF2	Fator de crescimento básico de fibroblasto
FGF-7	Fatores de crescimento de fibroblastos-7
FGF-10	Fatores de crescimento de fibroblastos-10
fr	Frequência do som refletido
FSH	Hormônio folículo-estimulante
ft	Frequência do som transmitido

g	Gramas
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
h	Hora
hCG	Gonadotropina coriônica humana
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IFNT	Interferon tau
i.m.	Intramuscular
LH	Hormônio luteinizante
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mm²	Milímetros quadrados
n	Número amostral
OXTR	Receptor de ocitocina
P4	Progesterona
P-450scc	Citocromo P-450 de clivagem da cadeia lateral do colesterol
PAQR7	*Membrane P4 receptors type 7* (Receptor de P4 tipo 7 de membrane)
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
P-45017α	17α-Hidroxilase
P-450arom	Aromatase
RIA	*Radioimmunoassay* (radioimunoensaio)
UI	Unidades internacionais
US	Ultrassonografia
VEFGA	Fator de crescimento vascular endotelial – A

µg	Micrograma
3βHSD	3β-hidroxiesteroide-desidrogenase

1. INTRODUÇÃO

A produção de caprinos no Brasil vem crescendo ano a ano. Isso se deve às características peculiares destes animais, como: rusticidade, adaptabilidade, produção de leite, carne, couro e fibra. A exemplo de outras espécies, a eficiência reprodutiva é um dos principais fatores limitantes no sistema produtivo de caprinos.

As cabras são poliéstricas estacionais de dias curtos, tendo, portanto, sua atividade reprodutiva restrita durante o ano. Desta forma, tornam-se necessárias estratégias de manejo para a indução de estro, quando estas encontram-se no período da contra estação reprodutiva. A utilização de protocolos hormonais à base de progesterona (P4), prostaglandina e gonadotropina é uma medida eficaz e rotineira em rebanhos comerciais (FATET et al., 2011; FONSECA; SOUZA, 2011).

Diversos são os fatores associados à fertilidade dos animais. É bem conhecido o fato de que a secreção de P4 pelo corpo lúteo (CL) é essencial para a manutenção da gestação nessa espécie (MEITES et al., 1951). Sendo assim, a função anormal do CL, com produção insuficiente de P4, tem sido relatada como uma das causas de perda gestacional, pela não adequação do ambiente materno ao estabelecimento e/ou manutenção da gestação (LONERGAN et al., 2016). Ressalta-se que em animais induzidos ao estro a perda gestacional pode chegar até 60% (GORDON, 1997). Além disso, Rhind et al. (1978) relataram que em ovelhas, na estação de transição, a concentração plasmática de P4 é baixa, quando comparado à estação reprodutiva.

Algumas estratégias já foram propostas para elevar a concentração de P4, como por exemplo: a manipulação do desenvolvimento folicular para aumentar o diâmetro do folículo pré-ovulatório e consequentemente o CL; suplementação com P4 exógena; estimulação direta do CL com agentes luteotrópicos e pela indução do CL acessório (CLA) após administração de hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) ou gonadotropina coriônica humana (hCG). Por meio da administração de hCG cinco dias após o estro é

possível promover a ovulação do folículo dominante da primeira onda folicular do ciclo estral, com formação de CLA, e com isso, elevar as concentrações plasmáticas de P4 (FONSECA et al., 2001; RIZOS et al., 2011) e taxa de gestação em bovinos (NASCIMENTO et al., 2013) e ovinos (FERNANDEZ et al., 2018, 2019; FONSECA et al., 2018), mas a literatura ainda é incipiente em caprinos (FONSECA et al., 2005; FONSECA et al., 2006).

Em caprinos, o folículo dominante atinge o seu diâmetro máximo no dia 7 após o estro (DE CASTRO et al., 1999). Sendo assim, a administração de hCG neste momento poderia atuar promovendo a luteinização destes folículos, levando à formação de CLA, elevando a taxa de crescimento do CL original (da ovulação) e as concentrações de P4. Portanto, a administração de hCG 7 dias após o estro pode afetar positivamente a taxa de gestação, minimizando a perda embrionária em cabras leiteiras.

2 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA CAPRINOCULTURA

O Brasil possui um rebanho de caprinos com aproximadamente 10 milhões de animais (FAOSTAT, 2018), sendo a região nordeste do país responsável por 93% do rebanho, mas é na região Sudeste que a produção de caprinos é mais especializada e onde cresce a produção de leite, queijo e derivados (IBGE, 2016).

Historicamente, várias raças de caprinos foram introduzidas no Brasil com a intenção de aumentar a eficiência da produção nacional. A seleção e multiplicação de genótipos apropriados para vários sistemas de produção encontrados no país têm sido importantes para o desenvolvimento do setor (LÔBO, 2010). A produção de caprinos vem crescendo ano a ano devido a sua rusticidade, adaptabilidade, produção de leite, carne, couro e fibra, apresentando um papel de grande importância principalmente para a economia dos países em desenvolvimento, em especial para aqueles com condições climáticas adversas ou terras sub-férteis (AMIRIDIS et al., 2012).

2.2 ESTACIONALIDADE REPRODUTIVA

Sendo a eficiência reprodutiva um dos principais fatores limitantes No sistema produtivo de caprinos, tornam-se necessários maiores estudos para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas reprodutivas para estes animais (FONSECA; SOUZA, 2011), como protocolos de indução/sincronização, inseminação artificial (IA) e produção *in vivo* e *in vitro* de embriões (AMIRIDIS et al., 2012).

As cabras são poliéstricas estacionais de dias curtos, tornando-se sexualmente ativas em resposta à diminuição do comprimento do dia, que ocorre no final do verão e início do outono, e cessa gradualmente com o aumento do número de horas luz por dia. O início e duração da estação reprodutiva vai depender de vários fatores como latitude, clima, raça e manejo reprodutivo (FATET et al., 2011). Os animais expressam variações sazonais

em relação ao comportamento sexual, parâmetros espermáticos, qualidade de gametas e taxa de ovulação, acarretando também em uma disponibilidade sazonal de produtos derivados destes animais (CHEMINEAU et al., 2010). Segundo Barrell et al. (1992), as mudanças sazonais na atividade reprodutiva originam-se, quase que exclusivamente, de oscilações nas secreções, pela hipófise, do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH), que é controlada pela pulsatilidade do GnRH em nível hipotalâmico.

Por enfraquecer a cadeia produtiva, tornando inconstante a receita obtida, os produtores procuram reverter a estacionalidade reprodutiva dos caprinos utilizando protocolos hormonais ou metodologias naturais visando obter melhores índices produtivos (BALARO et al., 2017a). Estratégias de indução e sincronização de estro são comumente utilizadas. A sincronização de estro é a concentração de fêmeas em estro em intervalo restrito, entre 24 a 72 h, durante a estação reprodutiva (FONSECA et al., 2007; FONSECA et al., 2009). Em caprinos, a sincronização pode ser obtida pelo prolongamento da fase lútea por meio de progestágenos em associação a outros hormônios, como a gonadotropina coriônica equina (eCG), hCG e o FSH, ou pela redução desta fase, com o uso de agentes luteolíticos como análogos de prostaglandina (PGF2α) (FATET et al., 2011). Quando os animais estão no período de anestro ou transição, o estro precisa ser induzido, utilizando-se progestágenos associados a gonadotrofinas, programas de luz artificial ou efeito macho (BALARO et al., 2017a).

Existem diferentes protocolos de indução de estro que utilizam alterações na dose, duração, no tipo e na via de administração de progestágenos, no uso ou não de prostaglandinas e no uso e momento de aplicação de gonadotrofinas (FONSECA; SOUZA, 2011). Dentre os diferentes progestágenos existentes, os mais utilizados são os dispositivos intravaginais, sendo eles: esponjas contendo acetato de fluorogesterona, os de liberação lenta de progesterona verdadeira e o acetato de medroxiprogesterona. Gonadotrofinas e prostaglandinas são administradas 24 a 48 h antes ou no momento da retirada do dispositivo intravaginal (UNGERFELD; RUBIANES, 2002; FONSECA; SOUZA, 2011).

Dentro das estratégias naturais para a sincronização ou indução de estro sincronizado em caprinos existem os programas de luz artificial, onde as

fêmeas são submetidas a 16 h de luz e 8 h de escuro com duração de 60 dias. A manifestação de estro ocorre por volta de 60 dias após o final do programa. Além dessa estratégia, também pode-se lançar mão do efeito macho, onde realiza-se o afastamento dos machos do rebanho por 60 dias e quando reintroduzidos induzem o estro nas fêmeas em torno de 72 h. Portanto, é uma ferramenta de fácil aplicação (FONSECA; SOUZA, 2011; BALARO et al., 2017a).

2.3 CICLO ESTRAL

O ciclo estral consiste em alterações morfológicas e fisiológicas que ocorrem no trato genital das fêmeas, levando a preparação do aparelho reprodutivo para a cópula, fecundação e implantação embrionária, além de expressão de estro e a ocorrência da ovulação. O ciclo estral de cabras dura em média 21 dias. Durante este período, uma série de alterações nos folículos ovarianos ocorre e é dependente do perfil hormonal predominante (estrogênico e progesterônico). Este processo é conhecido como dinâmica folicular ovariana, um processo de crescimento e regressão de folículos antrais até o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório no ovário e sua posterior ovulação ou involução (FONSECA, 2002).

O crescimento folicular evolui de forma ondulatória ao longo do ciclo, as ondas foliculares. A onda folicular é caracterizada de forma geral, por uma sequência de três eventos: emergência ou recrutamento, seleção ou desvio e dominância. Do ponto de vista hormonal, são relatados quatro estágios de acordo com a atividade hormonal predominante: gonadotrofina independente, FSH dependente correspondente à fase de recrutamento, FSH e LH dependente e LH dependente (GINTHER et al., 1996). Ginther e Kot (1994) realizaram um estudo da dinâmica folicular em cabras por avaliação ultrassonográfica, onde evidenciaram que o intervalo entre as ovulações, nesse grupo, é composto por quatro ondas de emergência folicular, na maioria das fêmeas. A quarta e última onda é a chamada onda ovulatória. A primeira e última onda apresentam folículos dominantes maiores que os das ondas intermediárias. A luteólise ocorre de um a cinco dias após a emergência da

última onda ovulatória, quando o diâmetro dos folículos ovulatórios variou de 4 a 8 mm.

A fase lútea começa a partir do momento da ovulação. Desde esse momento, as células do folículo ovulatório se transformam em células lúteas formando o CL. Ele secreta P4 fazendo com que concentrações desse hormônio aumentem e permaneçam em um nível elevado durante 16 dias. Durante a fase luteal, o crescimento folicular dependente de gonadotropina continua de uma forma ondulante, mas a P4 inibe a ovulação. No final da fase lútea, 16-18 dias após o estro, a prostaglandina F2α (PGF2α) secretada pelo útero não gravídico induz a regressão do CL (luteólise) e a diminuição da secreção de P4. A diminuição das concentrações plasmáticas deste hormônio remove gradualmente a inibição da secreção de hormônios gonadotrópicos e inicia-se então uma nova fase folicular. A fase lútea é também chamada de pós-estro, que pode ser dividida em metaestro, quando as concentrações séricas de P4 começam a subir, e diestro, quando as concentrações séricas de P4 são altas e constantes, até o início da luteólise (FATET et al., 2011).

2.4 FORMAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E INVOLUÇÃO DO CORPO LÚTEO

O CL é uma glândula endócrina transitória essencial para manutenção da gestação em cabras (MEITES et al., 1951) e suas funções endócrinas são controladas pelo eixo hipotalâmico-hipofisário (YI-FAN JIANG et al., 2016). Sua formação é uma continuação do processo de maturação folicular, incluindo hipertrofia, hiperplasia e migração celular. É formado pelas células da granulosa e da teca junto com células endoteliais, pericitos, células musculares lisas, fibrócitos, macrófagos, leucócitos e plasmócitos ocasionais, que variam muito em número, ultraestrutura química e função durante o desenvolvimento, diferenciação e regressão do CL. Além da P4 como o principal hormônio esteróide, o CL também secreta pequenas quantidades de prostaglandinas, 17β-estradiol e uma variedade de hormônios protéicos (ALILA; HANSEL, 1984; SANGHA et al., 2002).

Assim como o CL de outros ruminantes, o CL da cabra apresenta dois tipos de células esteroidogênicas que são as células luteais grandes e pequenas. Elas são células morfologica e bioquimicamente diferentes (FARIN

et al., 1986). A luteinização das células da granulosa é controlada pelo LH e pela vascularização, transporte de oxigênio, nutrientes, hormônios e outros fatores. A secreção de hormônios esteróides pelos tecidos ovarianos é crucial para a coordenação da ciclicidade reprodutiva (SANGHA et al., 2002). Bioquimicamente, a biossíntese de hormônios esteróides é modulada pela disponibilidade de colesterol e pela expressão de enzimas esteroidogênicas específicas (STOCCO; CLARK, 1997). A conversão do colesterol em pregnenolona é realizada nas mitocôndrias por um membro da superfamília de enzimas do citocromo P-450, conhecido como citocromo P-450 de clivagem da cadeia lateral do colesterol (P-450scc). A pregnenolona é a matéria-prima para a produção de P4 pela 3β-hidroxiesteroide-desidrogenase (3βHSD). Após a onda de LH pré ovulatória, há um aumento nas concentrações de RNAm que codificam a enzima P-450scc e 3βHSD, facilitando as altas taxas de produção de P4. Ao mesmo tempo, também ocorre a diminuição na expressão das enzimas responsáveis pela síntese de estrogênio, a 17α-Hidroxilase (P-45017α) e a aromatase (P-450arom) (SMITH et al., 1994).

Um componente essencial do desenvolvimento luteal é o recrutamento de um suprimento de sangue. Durante a formação do CL, a parede folicular contendo a camada granulosa avascular sofre uma transição para se tornar o tecido mais vascular do corpo (SMITH et al., 1994). O CL é 50% composto por células vasculares endoteliais. Os vasos lúteos são caracterizados em vasos capilares, sem camada de músculo liso; e vasos arteriolovenosos (~40 µm) e venosos (~30 µm), que possuem uma camada de musculatura lisa (SHIRASUNA et al., 2012). A angiogênese e a proliferação celular do CL depende de fatores angiogênicos como o fator de crescimento vascular endotelial – A (VEFGA) e o fator de crescimento básico de fibroblasto (FGF2). O sistema imunológico inato também tem seu papel na angiogênese e crescimento do CL, onde observa-se o recrutamento de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos logo após a ovulação (MIYAMOTO et al., 2013).

Na luteólise, a concentração plasmática de P4 diminui de forma abrupta nas primeiras 24 h, assim como o fluxo sanguíneo luteal, o que ressalta a importância de uma boa suplementação sanguínea como uma condição indispensável para uma boa produção de P4. Já a biometria luteal, apresenta uma redução mais tardia. Para que um CL seja considerado funcional, deve-se

ter 30% de área vascular mínima e 9,0 mm de diâmetro (ARASHIRO et al., 2010; BALARO et al., 2017b). Portanto, a luteólise é caracterizada pela perda da capacidade esteroidogênica e posterior involução estrutural e morfológica. Isso ocorre devido a produção pulsátil de PGF2α no útero, que chega ao ovário através de um sistema contracorrente útero-ovário. A síntese de PGF2α é controlada pelo estrogênio e pela P4 que regulam a concentração de receptores de ocitocina endometrial através de um sistema cíclico de retroalimentação positiva (McCRACKEN et al., 1999).

2.5 FISIOLOGIA DA GESTAÇÃO

A cópula ocorre durante o estro, geralmente antes da ovulação. Assim, o espermatozoide vai progredir pelo trato reprodutivo da fêmea e devem estar presentes na tuba uterina no momento da ovulação. Parte dos espermatozoides fica retido e vai sendo liberado continuamente no colo do útero. O principal modo de transporte de espermatozoides é a contratilidade do trato reprodutivo feminino, embora a motilidade do espermatozoide seja importante para a migração através do muco no colo do útero. O oócito pode permanecer viável de 10 a 25 h. A fertilização ocorre na tuba uterina algumas horas após a ovulação (FATET et al., 2011).

O oócito fertilizado se desloca pela tuba uterina, em direção ao útero, enquanto passa por sucessivas divisões. O embrião, no estágio de mórula, atinge o útero de quatro a cinco dias após o estro. A mórula da origem a um blastocisto que é formado por uma massa celular interna e uma blastocele ou cavidade central cercado por uma monocamada de trofectoderma. O blastocisto esférico eclode da zona pelúcida entre os dias nove e 10; e continua a crescer, mudando de uma forma esférica para oval entre os dias 12 e 14, durante uma fase transitória precedendo o alongamento, após o qual é denominado concepto (embrião e membranas extraembrionárias associadas). A ação da progesterona no endométrio uterino é fundamental para o crescimento e alongamento do concepto. As principais mudanças no endométrio necessárias para estimular o alongamento do concepto ocorrem entre os dias 7 e 13 em resposta à progesterona ovariana (FATET et al., 2011; DORNIAK et al., 2013; SPENCER et al., 2013).

A migração do oócito/embrião é o resultado de movimentos combinados de células epiteliais ciliadas da tuba uterina, atividade peristáltica das camadas musculares e fluido produzido pelo útero. O alongamento do concepto envolve o aumento do comprimento e peso do trofectoderma, além do início da diferenciação das membranas extraembrionárias, incluindo gastrulação do embrião e formação do saco vitelino e alantoide, que são vitais para a sobrevivência embrionária. O trofectoderma do concepto em crescimento e alongamento sintetiza e secreta prostaglandinas (PGs) e depois o interferon tau (IFNT), que é o sinal para o reconhecimento materno da gestação em ruminantes (SPENCER, 2013; BAZER, 2018).

O IFNT é secretado pelo concepto alongado após o 15º dia de gestação e silencia a expressão do receptor de estrogênio a (ESR1) e do receptor de ocitocina (OXTR) para prevenir a liberação de pulsos luteolíticos do fator de crescimento placentário induzido pela ocitocina para manutenção do CL (BAZER, 2009). As células estromais produzem vários fatores de crescimento, como fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fatores de crescimento de fibroblastos-7 e -10 (FGF-7, FGF-10), que possuem receptores expressos especificamente nos epitélios endometriais. Esses fatores podem ser responsivos à P4 e mediar as interações epitélio-mesenquimais que são cruciais para o suporte da gestação (SPENCER; BAZER, 2002).

A implantação do embrião é observada entre 18 a 22 dias após o início do estro (FATET et al., 2011; SPENCER, 2013). A receptividade uterina e a implantação de blastocistos incluem a eclosão da zona pelúcida, o pré-contato com o epitélio luminal (EL) uterino e orientação do blastocisto, aposição entre o trofectoderma e EL uterino e adesão do trofectoderma ao EL uterino. Durante o reconhecimento materno da gestação e os estágios iniciais da implantação, ocorre a perda de receptores de P4 no epitélio uterino e perda da expressão de genes como MUC1, que impede a fixação do blastocisto (BAZER, 2010).

O CL é indispensável durante a gestação em cabras para manutenção da produção de P4. A produção de P4 pela placenta é incapaz de manter a prenhez. A duração da gestação nesses animais tem uma média de 149 dias, podendo variar entre as raças (FATET et al., 2011).

2.6 UTILIZAÇÃO DA hCG

Em humanos, a hCG é o primeiro sinal hormonal do embrião e a transcrição do RNAm se inicia no estágio de 8 células. O blastocisto expressa a hCG anteriormente a implantação, com o aumento da sua expressão após esse fenômeno pelo sinciciotrofoblasto (MAKRIGIANNAKIS et al., 2017).

A hCG é um hormônio glicoproteico, assim como o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) e consiste em duas subunidades, α e β. A subunidade α é comum a todos os hormônios glicoproteicos, já a subunidade β representa a atividade biológica. A subunidade β da hCG é semelhante à do LH (80% de homologia), o que nos permite utilizá-lo quando se é necessário um efeito de LH (DE RENSIS et al., 2010). Sua meia-vida apresenta uma fase rápida de 5 a 9 h e uma fase lenta que dura entre 24 a 33 h (STENMAN et al., 2006). Sua atividade dura mais que a do LH, levando cerca de 66 h para chegar aos níveis basais e seu efeito luteinizante em células ovarianas é reconhecido em várias espécies de mamíferos.

A hCG induz a ovulação do folículo dominante da primeira onda folicular, quando administrado no quinto dia do ciclo estral, em novilhas, com consequente formação de CLA (FONSECA et al., 2000). Fonseca et al. (2003) também testaram o uso da hCG no quinto dia do ciclo estral em cabras. Como resultado, não houve aumento na taxa de gestação dos animais tratados, porém a concentração plasmática de P4 foi elevada nos dias 13 e 17 do ciclo estral. Isto confirma o efeito luteotrófico da hCG na cabra, podendo elevar a taxa de gestação em situações em que a P4 for o fator limitante para seu estabelecimento. Fernadez et al. (2017) avaliaram a administração da hCG no quarto dia após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em ovelhas e conseguiram induzir a formação de CLA e aumentar a concentração sérica de P4. Rizos et al. (2011) administraram hCG no D5 em bovinos e isto resultou no aumento do comprimento e largura do concepto quando comparado ao grupo controle. Além disso, esses parâmetros foram correlacionados com a secreção de IFNT *in vitro*.

Na cabra, o folículo dominante atinge seu diâmetro máximo no sexto dia após ovulação ou sete dias após início do estro (DE CASTRO et al., 1999).

Desta forma, este momento é promissor para a administração da hCG na tentativa de indução da ovulação/luteinização do folículo dominante da primeira onda folicular e posterior formação do CLA.

2.7 USO DA ULTRASSONOGRAFIA

O ultrassom foi descrito por Curie e Curie em 1880 e desde então a ultrassonografia vem sendo utilizada para avaliação do ovário e útero dos animais domésticos, se tornando uma prática estabelecida na produção animal nos anos 90. Seu uso possibilitou o diagnóstico de gestação mais precoce, a observação do desenvolvimento da dinâmica folicular em tempo real, tornando-se uma ferramenta diagnóstica muito importante para o entendimento da fisiologia ovariana e desenvolvimento de protocolos de tratamentos hormonais (KING, 2006; MIYAMOTO et al., 2006).

Para a obtenção da imagem ultrassonográfica são utilizadas ondas sonoras de alta frequência produzidas pelas vibrações dos cristais piezoelétricos presentes no transdutor, formando uma imagem bidimensional. A vibração dos cristais piezoelétricos é produzida por pulsos elétricos e as ondas sonoras são direcionadas através dos tecidos sendo refletidas de volta para o transdutor que as converte em corrente elétrica e formam a imagem (GRIFFIN; GINTHER, 1992).

A ultrassonografia em modo B é a mais utilizada e sua imagem é uma exibição bidimensional de pontos ou pixels (GRIFFIN; GINTHER, 1992), que é o menor elemento de uma imagem. A escala de cinza de um pixel varia do preto puro (zero) ao branco puro (255). O valor do pixel é representativo à amplitude da onda refletida que retorna ao transdutor, ou seja, quanto maior o eco produzido, maiores serão os valores de pixels e mais claras serão as imagens (TOM et al., 1998).

Como forma de avaliação da eficiência de tratamentos hormonais em fêmeas domésticas, a ultrassonografia transretal vem sendo muito utilizada para o estudo do sistema reprodutivo desses animais. Simões et al. (2005) compararam a avaliação ultrassonográfica do CL com avaliação por laparotomia, laparoscopia e técnica de fatiamento e não houve diferença estatística em relação a identificação dos CLs, provando que a ultrassonografia

em tempo real é um método altamente confiável para detecção e mensuração de estruturas ovarianas em cabras, além de ser um método não invasivo.

Simões et al. (2007) foram os pioneiros no uso da ultrassonografia modo-B para avaliação do CL caprino, onde realizaram a caracterização de duas imagens ultrassonográficas modo-B distintas: uma imagem de quando o CL está em fase de amadurecimento ou luteólise, com contorno irregular e ecotextura heterogênea e outra imagem era do CL em fase madura com contorno regular e ecotextura granular. Além disso, elucidou o número e diâmetro (mm) dos CL ao longo do ciclo estral e a sua relação com a concentração de P4.

Quando um feixe de ultrassom encontra um objeto em movimento, a frequência das ondas sonoras refletidas é alterada, o que chamamos de efeito Doppler. O deslocamento de frequência Doppler (fd) é a diferença entre a frequência do som transmitido (ft) e a frequência do som refletido (fr). Quando o objeto (por exemplo, uma célula sanguínea) está indo em direção ao transdutor, o eco de retorno terá uma frequência mais alta, ou seja, a fd será positiva. Já quando que um objeto se afasta do transdutor, a frequência é reduzida, mais baixa do que a transmitida, ou seja, a fd será negativa (KING 2006; CARVALHO et al., 2008).

A ultrassonografia com Doppler colorido começou a ser utilizada há três décadas para analisar a circulação sanguínea do CL em mulheres (BABER et al., 1988). Nestes estudos preliminares, foi possível detectar diferenças no fluxo sanguíneo luteal na mulher (MIYAZAKI et al., 1998) e posteriormente em animais, como ruminantes (BALARO et al., 2017a; PUGLIESI et al., 2016). Atualmente, o fluxo vascular luteal, pelo modo Doppler Colorido, pode ser mensurado subjetivamente por meio dos escore de vascularizações luteal (PUGLIESI et al., 2016) ou pela estimativa percentual de vascularização (0-100%) entre a área total do CL e a área repleta de vasos sanguíneos (SIQUEIRA et al., 2013). Todavia, pode haver baixo grau de repetibilidade entre operadores e, logo, tem sido proposta a mensuração objetiva pela área de vascularização (FIGUEIRA et al., 2015).

O uso do ultrassom para avaliação do CL nos fornece dados importantes sobre o status reprodutivo das fêmeas domésticas. Sua imagem é uniforme, circunscrita e menos ecogênica que o estroma ovariano. A

ultrassonografia com Doppler colorido nos fornece um meio confiável e rápido de análise, onde temos a presença de uma imagem em tempo real da arquitetura vascular, nos permitindo estimar a perfusão sanguínea dos tecidos e avaliar sua vascularização (OLIVEIRA et al., 2018; VRISMAN et al., 2018).

Arashiro et al. (2010) estudaram a dinâmica luteal de cabras Toggenburg por meio de avaliações ultrassonográficas diárias dos ovários durante os 21 dias do ciclo estral. Os autores observaram que o momento médio de visualização do primeiro CL foi o 5º dia do ciclo estral (variando do 4º ao 7º dia) e aumentou progressivamente até o 9º dia. Balaro et al. (2017b) obtiveram resultados semenlhantes, onde, verificou-se que a biometria luteal e o fluxo sanguíneo luteal estabilizaram no 9º dia do ciclo estral, assim com os seus valores máximos no 12º e 13º dias do ciclo estral, respectivamente. No início do ciclo estral há um aumento do fluxo sanguíneo do CL e durante a sua regressão ocorre uma diminuição (VRISMAN et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito da administração de hCG sete dias após o início do estro na taxa de gestação de cabras leiteiras.

.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito da administração da hCG sete dias após o início do estro na(o):

- Formação de corpo lúteo acessório;
- Perfil de progesterona sérica;
- Qualidade do corpo lúteo em relação ao diâmetro, área e porcentagem de vascularização;
- Taxa de prenhez.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Federal Fluminense (nº 1021) (Anexo 1).

4.1 PERÍODO, LOCAL E ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O experimento foi realizado durante a estação de transição, nos meses de Dezembro a Janeiro (2017/2018), em rebanho comercial localizado no município de Piau, MG, Brasil (latitude 21°35′ S e longitude 43°15′ O).

Para seleção dos animais, foi realizada a mensuração do peso vivo, do escore de condição corporal (ECC; Escala de 1 a 5; DETWEILER et al., 2008) e exame ginecológico e ultrassonográfico para atestar a saúde reprodutiva. Foram utilizadas 96 cabras, com peso médio de 47,4 ± 1,0 kg e ECC de 2,8 ± 0,1.

4.2 DESENHO DO ESTUDO

Avaliou-se o efeito da administração de 300 UI de hCG (Vetecor; Laboratórios Calier, Barcelona, Espanha) i.m., no Dia 7 após início do estro (Dia 0), em cabras da raça Toggenburg induzidas ao estro sincronizado. As cabras alocadas no grupo CONTROLE receberam 1 mL de solução salina. As fêmeas foram alocadas em cada grupo à medida que apresentavam estro e foram acasaladas por monta natural. Nos Dias 7, 13, 17 e 21 foi realizada ultrassonografia modo B e Doppler a fim de determinar o diâmetro, área e porcentagem da vascularização do(s) corpo(s) lúteo(s) presente(s). Nos mesmos momentos, foi coletado sangue para avaliação do perfil de progesterona sérica. No Dia 30, foi realizado o diagnóstico de gestação dos animais.

4.3 INDUÇÃO HORMONAL DO ESTRO SINCRONIZADO E ACASALAMENTO

Todas as cabras receberam esponjas intravaginais contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon; Syntex Indústria Bioquímica e Farmacêutica S.A., Buenos Aires, Argentina) por seis dias. Às 24 h antes da retirada da esponja, 200 UI de eCG (Folligon; Intervet International B.V., Boxmeer, Holanda) e 30 µg de d-cloprostenol (Prolise; ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina) foram administradas por via intramuscular (i.m.). Depois da retirada das esponjas, foi realizada a observação de estro e acasalamento a cada 12 h, enquanto as fêmeas demonstravam estro. Os reprodutores utilizados foram previamente aprovados no exame andrológico, seguindo os critérios do Manual de Exame Andrológico (CBRA, 2013).

4.4 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS

Os exames ultrassonográficos (US) foram realizados sempre pelo mesmo operador. Foi utilizado um equipamento ultrassonográfico (Mindray M5Vet, Shenzhen, China) acoplado a um transdutor linear de 7,5 MHz. O transdutor foi adaptado a um tubo de PVC cortado longitudinalmente para que pudesse ser manipulado pela via transretal. Para proteção do transdutor foi utilizada uma camisa sanitária preenchida com 5 mL gel de carboximetilcelulose (Carbogel UTL; Carbogel Indústria e Comércio LTDA, São Paulo, Brasil), próprio para exame ultrassonográfico. As cabras foram colocadas em estação e contidas em um tronco próprio para pequenos ruminantes. Após a remoção das fezes foi introduzido 10 mL de gel de carboximetilcelulose no reto, por meio de uma seringa de 60 mL. Os procedimentos utilizados para localização dos ovários foram os mesmos preconizados por Souza et al. (2013). O transdutor foi introduzido no reto até a visualização da bexiga e útero, sendo que a visualização dos ovários foi obtida rotacionando-se o transdutor lateralmente para ambos os lados.

Imagens de modo-B e Doppler colorido foram salvas para avaliações posteriores. O diâmetro, a posição e as características das estruturas ovarianas foram anotados em fichas individuais. Nas imagens do modo-B foram feitas as

medições de área (cm²) e diâmetro (mm) folicular e luteal. O diâmetro das estruturas ovarianas foi obtido pela média das duas maiores distâncias entre dois pontos do CL e da cavidade antral dos folículos a partir de 3 mm. A área de tecido luteal (cm²) foi considerada como sendo a diferença entre a área luteal total, menos a área da cavidade, quando presente. Naqueles animais que apresentaram dupla ou tripla ovulação, a área luteal considerada para cada dia do ciclo foi a soma de todos os CLs visualizados. Nos vídeos com Doppler colorido, foram coletadas imagens correspondentes à seção transversal do CL em seu maior diâmetro para avaliação objetiva (área de vascularização em porcentagem) (Figueira et al., 2015)

4.5 COLETAS DE SANGUE E DOSAGEM DE PROGESTERONA SÉRICA

Um total de 25 cabras (n=12 do CONTROLE e n=13 do grupo hCG) foram submetidas à coletas de sangue por venopunção jugular em tubos a vácuo sem anticoagulante para a obtenção do soro, sempre no período pré-prandial. Os tubos com sangue eram acondicionados em caixa de isopor com gelo e levados para o laboratório onde foram centrifugados em centrífuga refrigerada, por 15 min, a 1500 *g*. Após centrifugação, o soro foi aspirado, estocado em microtubos de 1,5 mL e refrigerado a -20 ºC, até o momento da análise. A dosagem da concentração de P4 foi realizada pela técnica de radioimunoensaio em fase líquida utilizando kits comerciais (MP Biomedicals, LLC, Diagnostics Division, Orangeburg, NY, Estados Unidos da América), de acordo com as instruções do fabricante. A sensibilidade e o coeficiente intraensaio de variação foi de 0,05 ng/mL e 10%. Além disso, todos os dados estiveram dentro dos pontos mínimo e máximo da curva.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As seguintes variáveis foram obtidas neste experimento: Taxa de formação de CL ovulatório: número de fêmeas que apresentaram CL ovulatório visualizado no D7/ total de fêmeas x 100; Número de CLs ovulatórios por cabra visualizados no D7; Taxa de formação de CL acessório: número de fêmeas que

apresentaram CLA visualizados no D7/ total fêmeas x 100; Concentração sérica de progesterona em cada dia; Área (cm^2) e diâmetro (mm) de tecido luteal; Porcentagem da área de vascularização do CL; Taxa de gestação: número de fêmeas gestantes/ número de fêmeas expostas x 100. Dados são apresentados em Média ± EPM.

Os dados foram verificados quanto à normalidade e homocedasticidade pelos testes de Lilliefors e Cochran. Os dados com distribuição normal e variância homogênea foram analisados pela ANOVA e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste t de Student ou pelo teste de Tukey. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn ou pelo teste do qui-quadrado, dependendo da variável. A análise estatística foi realizada no SAEG® e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5 CAPÍTULO II

Human chorionic gonadotropin (hCG) on Day 7 after estrus improve pregnancy rate in dairy goats

Luana Rangel Côrtes[a*], Joanna Maria Gonçalves Souza-Fabjan[a*], Dafne dos Santos Dias[b], Brenda Barbosa Martins[c], Ana Lucia Rosa Silva e Maia[a], Maíra de Oliveira Fraga[d], Eduardo Kenji Nunes Arashiro[a], Felipe Zandonadi Brandão[a], Jeferson Ferreira da Fonseca[d]

[a] Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil Filho, 64, Niterói, RJ, CEP: 24320-340, Brazil

[b] Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade do Grande Rio, Rua Professor José de Souza Herdy, 1160, Duque de Caxias, RJ, CEP: 25071-202, Brazil

[c] Universidade Presidente Antônio Carlos, Av. Juiz de Fora, 1100, Juiz de Fora, MG, CEP: 36047-362, Brazil.

[d] Embrapa Caprinos e Ovinos, Estrada MG 133, km 42, Coronel Pacheco, MG, CEP: 36155-000, Brazil.

*Corresponding author: E-mail adresses: joannavet@gmail.com (J.M.G. Souza-Fabjan); luana_rcortes@hotmail.com (L.R. Côrtes).

Tel.: +55 21 2629-9525

Artigo submetido ao periódico: *Reproduction in Domestic Animals*

Em: 29/01/2019; **Qualis:** A2 – Medicina Veterinária

Abstract

This study aimed to assess the role of exogeneous hCG on Day 7 after estrus on the ovulatory corpus luteum (CL), accessory CL (ACL) formation, serum progesterone concentrations and pregnancy rate in dairy goats. A total of 96 Toggenburg female goats received an intravaginal sponge containing 60 mg of medroxyprogesterone acetate for six days. Both 200 IU equine chorionic gonadotropin and 30 µg of d-cloprostenol i.m. were administered 24 h before sponge removal. After sponge removal, estrus detection and breeding were performed. Seven days (D7) after estrus, females received either 1 mL of saline (CONTROL group) or 300 IU human chorionic gonadotropin (hCG group) i.m. Ultrasound exams were performed on Day 7, 13, 17 and 21 after estrus and pregnancy rate was verified on D30. Estrus response rate was overall 89.6% (86/96). The area of luteal tissue, luteal vascularization and the luteal tissue diameter did not reveal important differences between both groups. The ACL formation rate was 46.5% (20/43) for hCG and 0% for CONTROL goats and all females that developed ACL became pregnant. Pregnancy rate was higher ($P<0.05$) in hCG-goats (90.7%; 39/43) than in CONTROL-goats (74.4%; 32/43). In conclusion, hCG administration on D7 after estrus positively affected the pregnancy rate in dairy goats.

Keywords: Accessory corpora lutea; Conception rate; Doppler ultrasonography; Gonadotropin; Progesterone concentration.

1. Introduction

Brazil has a goat herd with approximately 10 million animals (FAOSTAT, 2018). The northeast region part of the country owns 93% of the herd, but it is in the Southeast region that the goat production is more specialized and where the milk, cheese and other derivatives production has grown (IBGE, 2016). Goats are seasonal polyoestrous animals, becoming sexually active in response to the decrease in day length. Thus, the reproductive management must be associated to the use of strategies to induce estrus in the nonbreeding season, such as hormonal protocols containing gonadotropins (Gordon, 1997).

Several factors are related to the fertility of goats. It is well known that corpus luteum (CL) and its progesterone (P4) secretion are essential for pregnancy maintenance in goats (Meites et al., 1951) and an abnormal function of CL has been reported as one of the main causes of gestational loss in the pre-implantation period (Lonergan et al., 2016). It is important to highlight that in estrous-induced animals the gestational loss can reach up to 60% (Gordon, 1997). In addition, high doses of exogenous P4, which are commonly used in estrous induction protocols, have altered the levels of 17β-estradiol and P4 in the blood plasma and oviductal wall, leading to decreased fertility (Theodosiadou et al., 2004). Furthermore, Rhind et al. (1978) observed that in sheep, in the transition season, the P4 concentration was lower when compared to the reproductive season.

Insufficient production of P4 may account for the non-adequacy to the maternal environment and/or pregnancy maintenance, since P4 was proposed as elementary education to work in conjunction with the functions (Lonergan et al., 2016). P4 has a paracrine function in the uterine epithelium and conceptus trophectoderm, facilitating the action of factors such as interferon tau (IFNT) and prostaglandin, expression of progestamedins and of an array of IFN-stimulate genes. This leads to changes in the transcriptomic profile, being extremely important for maternal recognition of pregnancy, implantation, lengthening and survival of the concept (Newton et al., 1996; Bazer et al., 2010, 2018; Lonergan and Forde 2014).

According to Lonergan et al. (2016), a variety of strategies can be used to increase serum P4 concentrations, such as: the manipulation of follicular

development to increase the size of the preovulatory follicle and thus the CL; use of direct supplementation with exogenous P4; direct stimulation of CL development with luteotropic agents; and by the induction of accessory CL (ACL) after administration of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) or hCG. It was demonstrated that the ACL formation increases plasma P4 concentrations and pregnancy rate in cattle (Rizos et al., 2011; Nascimento et al., 2013) and sheep (Fernandez et al., 2018, 2019; Fonseca et al., 2018), but the literature is incipient and controversial in goats (Fonseca et al., 2005; Fonseca et al., 2006).

In goats, the dominant follicle reaches its maximum diameter on D7 after estrus (De Castro et al., 1999). Therefore, administration of hCG at this time could act promoting the luteinization of these follicles leading to ACL formation, enhancing the growth rate of the original (ovulatory) CL and P4 concentrations. All these strategies may positively affect the pregnancy rate, minimizing the embryonic loss. Thus, the aim of the present study was to evaluate the role of exogeneous hCG on D7 after estrus on the ovulatory CL, ACL formation, progesterone concentrations and pregnancy rate in dairy goats.

2. Materials and methods

2.1. Ethics and animal care

The animal care Committee of the Universidade Federal Fluminense approved the study design (protocol number 1021/2017). Moreover, the experiment was conducted under the principles of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science, which regulates conditions for experiments involving animals.

2.2. Location and experimental conditions

This study was carried out in a dairy goat farm located in the Minas Gerais State, Brazil (latitude 21°35′S and longitude 43°15′W) in the nonbreeding season. According to the Köppen classification, the climate is type Cwa, characterized by a dry winter and hot summer (Peel et al., 2007).

The goats were managed in an intensive production system, confined in group pens, and were fed corn silage. A balanced concentrate supplement was

given according to their demand. Mineralized salt (Caprinofós® Tortuga, São Paulo, Brazil), and drinking water were available *ad libitum*.

2.3. Animals, treatments and estrus detection

A total of 96 Toggenburg female goats was used, with a mean body weight (BW) of 49.2 ± 10.5 kg and body condition score (BCS) of 2.8 ± 0.4 (1 to 5 scale, Detweiler et al., 2008). The females were allocated into three mobs of approximately 32 females each, with intervals of 1 week per mob, to respect male resting. All the animals received an intravaginal sponge containing 60 mg of medroxyprogesterone acetate (Progespon; Syntex S.A., Biochemical and Pharmaceutical Industry, Buenos Aires, Argentina) for six days. Both 200 IU eCG (Folligon; Intervet International B.V., Boxmeer, Netherlands) and 30 µg of d-cloprostenol (Prolise; Tecnopec LTDA, São Paulo, Brazil) i.m. were administered 24 h before sponge removal. After sponge removal, estrus detection and breeding were performed every 12 h with eight Toggenburg bucks previously submitted to andrological examination.

The experimental groups were randomly formed according to the order that goats were detected in estrus and to their category (nulliparous and pluriparous). Seven days (D7) after estrus, the females received either 1 mL of saline (CONTROL group, n=43) or 300 IU hCG (hCG group; n=43, Vetecor, Laboratorios Calier S.A., Barcelona, Spain) i.m.. The estrus signs observed in this experiment were: searching for the male; vocalization; restlessness; tailing; vulva hyperemia and edema; vaginal mucous discharge and immobility on mounting, which was a characteristic considered as the onset of estrus (Fonseca and Torres, 2005).

2.4. Ultrasonographic evaluation

The ultrasonographic exams were performed always by the same technician and in the same period of the day. The ultrasonographic equipment (Mindray M5Vet, Shenzhen, China) was coupled to a linear transducer of 7.5 MHz. The transducer was taped to a PVC tube so that it could be manipulated by the transrectal route. For protection of the transducer, a sanitary dressing filled with 5 mL carboxymethylcellulose gel (Carbogel UTL; Carbogel Indústria e

Comércio LTDA, São Paulo, Brazil) was used for ultrasonographic examination. Does were maintained in a standing position, fecal pellets were removed manually (with a finger), and 10 mL of carboxymethylcellulose gel was placed into the rectum with a syringe. The procedures used to locate the ovaries were the same as those recommended by Souza et al. (2011). The transducer was inserted in the rectum until the visualization of the bladder and uterus, and visualization of the ovaries was obtained by rotating the transducer laterally to both sides.

On Days 7, 13, 17 and 21 after estrus, B-mode and color-Doppler mode videos from both ovaries were recorded for subsequent evaluations. The diameter, position and characteristics of the ovarian structures were recorded in individual sheets. From B-mode, frozen images were measured for luteal area (mm^2) and luteal diameter (mm). The diameter of the ovarian structures was obtained by the average of the two largest distances between two points of the CL and the antral follicle cavity from 3 mm. The area of luteal tissue (cm^2) was the difference between the total luteal areas, minus the cavity area, when present. In those animals that presented double or triple ovulation, the luteal area considered for each day of the cycle was the sum of all CLs visualized. Upon color-Doppler videos, images corresponding to the CL cross-section were collected in its greater diameter for objective evaluation (area of vascularization in percentage) (Figueira et al., 2015). The pregnancy diagnosis was verified on D30 in all goats by observation of the embryonic vesicle for a viable placenta and fetus having a heartbeat.

2.5. Serum progesterone concentrations (P4)

A total of 25 goats (n=12 from CONTROL and n=13 from hCG group) were submitted to blood collection by jugular venipuncture in vacuum tubes without anticoagulant to obtain the serum, always in the preprandial period, on D7, D13, D17 and D21 after estrus. The tubes were immediately placed on ice, transported to the laboratory, and centrifuged in a refrigerated centrifuge for 15 min at 1500 *g*. After centrifugation, the serum was aspirated, stored in 1.5 mL microtubes and refrigerated at - 20 °C until the time of analysis. The progesterone concentrations were determined by commercial solid phase radioimmunoassay (RIA) kit (MP Biomedicals, LLC, Diagnostics Division,

Orangeburg, NY, EUA), according to the manufacturer's instructions. The assay sensitivity and intra-assay coefficients of variation were 0.05 ng/mL and 10%. In addition, all data were within the maximum and minimum points of the curve.

2.6. Variables and statistical analysis

The following end points were obtained in this experiment: Ovulatory CL formation rate: number of females showing CL from ovulation visualized at D7/ total females x 100; Number of ovulatory CLs per goat visualized at D7; Accessory CL formation rate: number of females showing accessory CL visualized after D7/ total females x 100; Serum progesterone concentrations in each Day; Area (cm^2) and diameter (mm) of luteal tissue; Percentage of the CL vascularization area; Pregnancy rate: number of pregnant females / number of females exposed x 100. Data are presented as Mean + SEM.

Data were checked for normality and homoscedasticity by Lilliefors and Cochran tests. Data with normal distribution and homogeneous variance were analyzed by ANOVA and differences between means were compared by either Student t or Tukey test. Non-parametric data were analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn test or by Chi-square test depending on the variable. Statistical analysis was performed in SAEG® and differences were considered significant when $P<0.05$.

3. Results

3.1 Estrus response

Estrous response rate was overall 89.6% (86/96) and thus the 10 females that did not show estrus signs were not allocated into the experimental groups.

3.2. Ultrasonographic evaluation and pregnancy rate

In D7, the area of luteal tissue was similar ($P>0.05$) for hCG (2.48 ± 0.2 cm^2) and CONTROL (2.28 ± 0.2 cm^2) goats, and in both groups a progressive increase ($P<0.05$) until D13 was found. In D17 and D21, only the data of the goats that were pregnant were used and no difference ($P>0.05$) was found between both days. The comparison between both groups did not reveal any

difference (*P*>0.05). Luteal vascularization had no difference (*P*>0.05) between groups or in intragroup analysis in any treatment. The luteal tissue diameter was similar (*P*>0.05) between hCG and CONTROL goats.

The number of CL in D7 was similar (*P*>0.05) in hCG compared to CONTROL-goats (1.58 ± 0.1 and 1.72 ± 0.14, respectively). Interestingly, no goat from the CONTROL group formed any ACL. On the other hand, in the hCG group, the ACL formation rate was 46.5% (20/43). Out of these, 19 (95%) had one ACL and one goat (5%) developed two ACL. This led to a final number of CL (original + accessory) after treatment in hCG group of 2.05 ± 0.12, which was greater (*P*<0.01) than their CL number in D7. It is important to highlight that all goats that developed ACL became pregnant. Pregnancy rate was higher (*P*<0.05) in hCG-goats (90.7%; 39/43) than in CONTROL-goats (74.4%; 32/43).

3.3. Serum P4 concentrations

Except on D21, there was no difference on serum P4 concentrations throughout the cycle between groups or in intragroup analysis in any treatment (Table 1). Regardless of the treatment, animals presenting > 1 CL had greater P4 concentrations than those with only 1 CL.

Table 1. Serum progesterone concentrations (Mean ± S.E.M.) in dairy goats receiving either hCG or saline (CONTROL) on Day 7 (D7) after estrus

			Progesterone (ng/mL)				
Group			D7	D13	D17	D21	D30
Hcg	ACL*	+	4.0 ± 0.5 [a]	5.0 ± 0.6 [a]	4.2 ± 0.6 [a,x]	6.1 ± 0.5 [b]	3.5 ± 0.5 [a]
		-	3.5 ± 0.6 [a]	4.0 ± 0.6 [a]	2.4 ± 0.2 [a,y]	5.3 ± 0.6 [b]	3.6 ± 0.5 [a]
	Pregnancy	+	4.0 ± 0.4	4.3 ± 0.4	3.3 ± 0.4	6.0 ± 0.4 [A]	3.6 ± 0.3
		-	4.3 ± 0.0	4.0 ± 0.0	3.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0 [B]	3.6 ± 0.0
	Total		4.0 ± 0.3 [a]	4.3 ± 0.4 [a]	3.3 ± 0.4 [a]	6.0 ± 0.4 [b]	3.6 ± 0.3 [a]
CONTROL	Pregnancy	+	4.5 ± 0.8	4.0 ± 0.8	3.0 ± 0.3 [A]	6.1 ± 0.6 [A]	4.3 ± 0.7 [A]
		-	3.3 ± 0.2	3.3 ± 1.0	0.7 ± 0.7 [B]	0.0 ± 0.0 [B]	0.0 ± 0.0 [B]
	Total		5.0 ± 0.8 [a]	4.0 ± 0.7 [a]	3.0 ± 0.3 [a]	6.1 ± 0.6 [b]	4.3 ± 0.7 [a]

[*] ACL: accessory corpus luteum

a,b: the P4 concentration differs in days of collection (D7, 13, 17, 21 and 30) within the same experimental group, pregnancy status and ACL.

x,y: differ between ACL status within the experimental group receiving hCG and the same day of P4 concentration analysis.

A,B: differ between pregnancy status within the same experimental group and day of analysis of P4 concentration.

X,Y: differ between the total results of the experimental groups (hCG vs CONTROL) within the same days of analysis.

4. Discussion

In this study we investigated the effect of administration of 300 IU of hCG on D7 after estrus in dairy goats, in the nonbreeding season, on the ACL formation, CL quality and serum P4 profile in order to increase the pregnancy rate. In the current study, the use of hCG on D7 significantly increased the

pregnancy rate when compared to the CONTROL group (90.7% vs 74.4%, respectively). Previous studies from our group reported the administration of 250 IU of hCG on D5 in goats with no benefits in the pregnancy rate (Fonseca et al., 2005; Fonseca and Torres, 2005; Fonseca et al., 2006). Perhaps the absence of hCG positive effect on pregnancy rate in the previous studies is related to the moment of its administration. It is well known that in goats the dominant follicle reaches its maximum diameter on D7 after estrus (De Castro et al., 1999) and possibly the hCG on D7 minimized any embryonic loss.

In the current study, there was ACL formation in 46.5% of the animals treated with hCG, confirming the efficiency of the protocol in inducing luteinization or ovulation of dominant follicles of the first wave (Menchaca and Rubianes, 2004). Our results corroborate to other studies that were also successful to induce ACL formation using hCG in sheep (Fernandez et al., 2018; Fonseca et al., 2018) and cattle (Rizos et al., 2011). Overall, animals with two or more CLs had a significantly higher P4 concentration than animals with only one CL. Interestingly, all females that developed the ACL became pregnant. Surprisingly, the area of luteal tissue, diameter and vascularization had no difference between both groups. It was expected that the use of hCG would promote an increase in the total area of luteal tissue in the ovary (Prashad and Guraya, 1987; Farin et al., 1988; Castro et al., 2015).

Serum P4 concentrations were also similar between groups. Previous studies have shown that the increase in the area of luteal tissue after the formation of ACL had a positive correlation with plasma P4 concentration (Arashiro et al., 2010; Fonseca et al., 2018). However, other researchers did not obtain the same positive correlation when comparing animals with different numbers of natural ovulations and CLs (Mann et al., 2007; Arashiro et al., 2010), demonstrating that the number of CLs is not necessarily associated to P4 concentrations. Among the animals that were treated with hCG, an increase in the P4 concentration in animals that developed ACL occurred in D17, which coincides with the moment of maternal recognition of pregnancy, leading us to believe that it occurred due to an effect of embryonic activity.

In humans, hCG is the first hormonal sign of the embryo; mRNA transcription occurs at the beginning of the 8-cell stage and the blastocyst

expresses hCG prior to its implantation, with an increased expression after this phenomenon by the syncytiotrophoblast (Makrigiannakis et al., 2017). The hCG has two subunits: hCG-α and hCG-β, and the latter has 85% amino acids homologous to the LH-β subunit, allowing the two hormones to bind to the same receptor (Keay et al., 2004). This means that hCG is a highly luteotropic hormone. The increase of LH at the beginning of pregnancy decreases the concentration of 17-β estradiol produced by the secondary and tertiary follicular waves, leading to a delay in the onset of the luteolytic cascade. This event results in increasing the time for embryonic development and pregnancy maternal recognition (Newcombe and Peters, 2014), with secretion of IFNT by the concept, which in goats occurs between days 16 and 21. The IFNT prevents the pulsating release of PGF, leading to the maintenance of CL (Bazer et al., 2018). Indeed, hCG stimulates the production of membrane P4 receptors type 7 (PAQR7) and C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) in the maternal endometrium and promotes the expression of pro-angiogenic factors in fetal extra-embryonic membranes (Coleson, 2015). Nephew et al. (1994) designed a beautiful study in sheep demonstrating that the hCG on D11.5 stimulated/improved uterine secretions, conceptus growth (blastocysts were longer), IFNT concentration and pregnancy rate. In a later study, the hCG administration on D5 also resulted in increased conceptus length and width compared to control and these parameters were correlated to the IFNT secretion *in vitro*, in the cattle model (Rizos et al., 2011). All these data suggest that in the current study the mechanism by which hCG has positively affected the pregnancy rate was due to a direct effect on embryo instead of via P4 enhancement.

5. Conclusion

Although the use of exogeneous hCG on D7 after estrus increased the number of ACL, it was not sufficient to affect either area or vascularization of CL, and thus progesterone secretion. However, the hCG positively affected the pregnancy rate in dairy goats, suggesting a direct effect of hCG on embryo viability.

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

This study was supported by the CNPq, FAPEMIG and EMBRAPA. The authors also thank all the farmers involved. LRC was supported by CNPq, ALRSM is a fellow of FAPERJ, and FZB and JFF of CNPq.

References

Arashiro, E.K.N., Viana, J.H.M., Fonseca, J.F., Camargo, L.S.A., Fernandes, C.A.C., Brandão, F.Z., 2010. Luteal dynamics in goats: morphological and endocrine features. Rev. Brasil. Zootec. 39, 1937-42.

Bazer, F.W., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Spencer, T.E., Wu, G., 2018. Mechanisms for the establishment and maintenance of pregnancy: synergies from scientific collaborations. Biol. Reprod. 99, 225–241. doi:10.1093/biolre/ioy047.

Bazer, F.W., Wu, G., Spencer, T.E., Johnson, G.A., Burghardt, R.C., Bayless, K., 2010. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. Mol. Hum. Reprod. 16, 135-152. doi: 10.1093/molehr/gap095.

Castro, A.C.R., Arashiro, E.K.N., Zambrini, F.N., Guimarães, A.S.L., Esteves, L.V., Fonseca, J.F., 2015. Effect of hCG administration on accessory corpus luteum formation and area in estrous induced nulliparous Santa Inês ewes. Anim. Reprod. 21, 148. Abstract.

Coleson, M.P.T., Sanchez, N.S., Ashley, A.K., Ross, T.T., Ashley, R.L., 2015. Human chorionic gonadotropin increases serum progesterone, number of corpora lutea and angiogenic factors in pregnant sheep. Reproduction 150, 43–52. doi: 10.1530/REP-14-0632.

De Castro, T., Rubianes, E., Menchaca, A., Rivero, A., 1999. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. Theriogenology 52, 399–411. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00138-7.

Detweiler, G., Gipson, T., Merkel, R., Goetsch, A., Sahlu, T., 2008. Body condition scores in goats. Annual Goat Field Day, 23. Langston University, Langston, 127–133.

FAOTAST, Food “Agriculture Organization Corporate Statistical Database”. Accessed on 2018.

Farin, C.E., Moeller, C.L., Mayan, H., Gamboni, F., Sawyer, H.R., Niswender, G.D., 1988. Effect of Luteinizing Hormone and Human Chorionic Gonadotropin on Cell Populations in the Ovine Corpus Luteum. Biol. Reprod. 38, 413–421. doi: 10.1095/biolreprod38.2.413.

Fernandez, J., Bruno- Galarraga, M.M., Soto, A.T., de la Sota, R.L., Cueto, M.I., Lacau, I.M., Gibbons, A.E., 2018. Hormonal therapeutic strategy on the induction of accessory corpora lutea in relation to follicle size and on the increase of progesterone in sheep. Theriogenology 105, 184–188. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.09.020.

Fernandez, J., Galarraga, M.M.B., Soto A.T., Sota R.L., Cueto M.I., Lacau-Mengido I.M., Gibbons, A.E., 2019. Effect of GnRH or hCG administration on Day 4 post insemination on reproductive performance in Merino sheep of North Patagonia. Theriogenology 126, 63-67. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.12.008.

Figueira, L.M., Fonseca, J.F., Arashiro, E.K.N., Souza-Fabjan, J.M.G., Ribeiro, A.C.S., Oba, E., Viana, J.H.M., Brandão, F.Z., 2015. Colour Doppler ultrasonography as a tool to assess luteal function in Santa Inês ewes. Reprod. Domest. Anim. 50, 643-650. doi: 10.1111/rda.12543.

Fonseca, J.F., Castro, A.C.R., Arashiro, E.K.N., Oliveira, M.E.F., Zambrini, F.N., Esteves, L.V., Brandão, F.Z., Souza-Fabjan, J.M.G., 2018. Effects of hCG administration on accessory corpus luteum formation and progesterone production in estrous-induced nulliparous Santa Inês ewes. Anim. Reprod. 15, 135-139. doi: 10.21451/1984-3143-AR2017-957.

Fonseca, J.F., Maffili, V.V., Rodrigues, M.T., Santos, A.D.F., Rovay, H., Pinto Neto, A., Brandão, F.Z., Torres, C.A.A., 2006. Effects of hCG on progesterone

concentrations and fertility in cyclic, lactating Alpine goats. Anim. Reprod. 3, 410-414.

Fonseca, J.F., Torres, C.A.A., 2005. Administration of hCG 5 days after breeding and reproductive performance in nulliparous dairy goats. Reprod. Domest. Anim. 40, 495–499. doi: 10.1111/j.1439-0531.2005.00612.x.

Fonseca, J.F., Torres, C.A.A., Maffili, V.V., Borges, A.M., Espeschit, C.J.B., Balbinot, P.Z., Oliveira, R.F.M., Leite, P.A.G., 2005. Desempenho reprodutivo de cabras alpinas tratadas com hCG cinco dias após o acasalamento. Rev. Brasil. Zootec. 34, 508-513.

Gordon, I., 1997. Controlled Reproduction in Sheep and Goats. University Press, Cambridge, UK.

IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal. 2016. Available in <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm>.

Keay, S.D., Vatish, M., Karteris, E., Hillhouse, E.W., Randeva, H.S., 2004. The role of hCG in reproductive medicine. BJOG: Int. J. Obst. Gynaec. 111, 1218–1228. doi:10.1111/j.1471-0528.2004.00412.x.

Lonergan, P., Forde, N. 2014. Maternal-embryo interaction leading up to the initiation of implantation of pregnancy in cattle. Animal 8, 64-69. doi: 10.1017/S1751731114000470.

Lonergan, P., Forde, N., Spencer, T., 2016. Role of progesterone in embryo development in cattle. Reprod. Fertil. Dev. 28, 66-74. doi: 10.1071/RD15326.

Makrigiannakis, A., Vrekoussis, T., Zoumakis, E., Kalantaridou, S., Jeschke, U., 2017. The Role of hCG in Implantation: A mini-review of molecular and clinical evidence. Int. J. Mol. Sci. 18, 1305. doi:10.3390/ijms18061305.

Mann, G.E., Robinson, R.S., Hunter, M.G., 2007. Corpus luteum size and function following single and double ovulations in non-lactating dairy cows. Theriogenology 67, 1256-61. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.01.011.

Meites, J. Webster, H. D., Young, F. W., Thorp Jr, F., Hatch, R. N., 1951. Effects of corpora lutea removal and replacement with progesterone on pregnancy in goats. J. Anim. Sci. 10, 411-16.

Menchaca, A., Rubianes, E., 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. Reprod. Fertil. Dev. 16, 403-13. doi: 10.10371/RD04037.

Nascimento, A.B., Bender, R.W., Souza, A.H., Ayres, H., Araujo, R.R., Guenther, J.N., Sartori, R., Wiltbank, M.C., 2013. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 96, 2873–82. doi:10.3168/JDS.2012-5895.

Nephew, K.P., Cárdenas, H., McClure, K.E., Ott, T.L., Bazer, F.W., Pope, W.F., 1994. Effects of administration oh human chorionic gonadotropin or progesterone before maternal recognition of pregnancy on blastocyst development and pregnancy in sheep. J. Anim. Sci. 72, 453-58.

Newcombe, J. R., Peters, A. R., 2014. The Buserelin Enigma; How Does Treatment with this GnRH Analogue Decrease Embryo Mortality? J. Veterinar. Sci. Technol. 5, 151. doi:10.4172/2157-7579.1000151.

Newton G.R., Ott, T.L., Woldesenbet, S., Shelton, A.H., Bazer, F.W., 1996. Biochemical and immunological properties of related small ruminant trophoblast interferons. Theriogenology 46, 703-716. doi: 10.1016/0093-691X(96)00222-1.

Peel, M.C., Finlayson, B.L., McMahon, T.A., 2007. Update world map of the Koppen–Geiger climate classification. Hydrol. Earth Syst. Sci. 11, 1633–44. doi: 10.5194/hess-11-1633-2007.

Prashad, R.K., Guraya, S.S., 1987. Effect of human chorionic gonadotropin and follicular fluid agglutinability on goat ovarian granulosa cells. Indian J. Anim. Sci. 57, 1187-90.

Rizos, D., Scully, S., Kelly, A.K., Ealy, A.D., Moros, R., Duffy, P., Al Naib, A., Forde, N., Lonergan, P., 2011. Effects of human chorionic gonadotrophin administration on Day 5 after oestrus on corpus luteum characteristics, circulating progesterone and conceptus elongation in cattle. Reprod. Fertil. Dev. 24, 472-481. doi: 10.1071/RD11139.

Rhind, S.M., Chesworth, J.M., Robinson, J.J., 1978. A seasonal difference in ovine peripheral plasma prolactin and progesterone concentrations in early

pregnancy and in the relationship between the two hormones. J. Reprod. Fertil. 52, 79-81.

Souza, J.M.G., Torres, C.A.A., Maia, A.L.R.S., Brandão, F.Z., Bruschi, J.H., Viana, J.H.M., Oba, E., Fonseca, J.F., 2011. Autoclaved, previously used intravaginal progesterone devices induces estrus and ovulation in anestrous Toggenburg goats. Anim. Reprod. Sci. 129, 50– 55. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.09.012.

Theodosiadou, E., Goulas, P., Kouskoura, T., Smokovitis, A., 2004. Oestrogen and progesterone concentrations in plasma and oviductal tissue of ewes exhibiting a natural or induced oestrus. Anim. Reprod. Sci. 80, 59–67. doi:10.1016/s0378-4320(02)00223-3

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o uso exógeno da hCG no Dia 7 após início do estro tenha elevado o número de CLA, isto não foi suficiente para afetar a área e a vascularização do CL e, desta forma, a secreção de progesterona. Entretanto, a hCG afetou positivamente a taxa de gestação em cabras leiteiras, sugerindo um efeito direto da hCG na viabilidade do embrião.

Referências Bibliográficas

ALILA, H.W.; HANSEL, W. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biology of Reproduction*, v. 31, p. 1015–1025, 1984.

AMIRIDIS, G.S. et al. Assisted reproductive Technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, v. 130, p. 152-161, 2012.

ANIMAL, CBRA–COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2013.

ARASHIRO, E.K.N. et al. Luteal dynamics in goats: morphological and endocrine features. *Brazilian Journal of Animal Science*, v.39, n.9, p.1937-1942, 2010.

BABER, R.J. et al. Transvaginal pulsed Doppler ultrasound assessment of blood flow to the corpus luteum in IVF patients following embryo transfer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 95, p. 1226–1230, 1998.

BALARO, M. F. A. et al. Sincronização e indução do estro em caprinos leiteiros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 41, p. 330-339, 2017a.

BALARO, M. F. A. et al. Luteal dynamic and functionality assessment in dairy goats by luteal blood flow, luteal biometry, and hormonal assay. *Theriogenology*, v. 95, p. 118-126, 2017b.

BARRELL, G.K. et al. Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. *Biology of Reproduction*, v.46, p.1130–1135, 1992.

BAZER, F. W. et al. Interferons and Uterine Receptivity. *Seminars in Reproductive Medicine*, v. 27, 2009.

BAZER, F. W. et al. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals, *Molecular Human Reproduction*, v.16, p. 135–152, 2010

BAZER, F.W. et al. Mechanisms for the establishment and maintenance of pregnancy: synergies from scientific collaborations. *Biology of Reproduction*, v. 99, p. 225–241, 2018.

CARVALHO, C. F. et al. Princípios físicos do Doppler em ultrassonografia. *Ciência Rural*, v. 38, p. 872-879, 2008.

CHEMINEAU, P. et al. Neuroendocrine and Genetic Control of Seasonal Reproduction in Sheep and Goats. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 45 , p. 42–49, 2010.

DE CASTRO, T. et al. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology*, v. 52, p. 399–411, 1999.

DE RENSIS, F. et al. Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: an update. *Theriogenology*, v. 73, n. 8, p. 1001-1008, 2010.

DETWEILER, G. et al. Body condition scores in goats. Annual Goat Field Day, 23. Langston University, Langston, p. 127–133, 2008.

DORNIAK, P. et al. PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation. *Journal of Animal Science*, v. 91, p. 1627–1638, 2013.

FAOTAST, Food “Agriculture Organization Corporate Statistical Database”. Accessed on 2018.

FARIN, C.E. et al. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, v. 35, p. 1299-1308, 1986.

FATET, A. et al. Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science*, v.124, p.211–219, 2011.

FERNANDEZ, J. et al. Hormonal therapeutic strategy on the induction of accessory corpora lutea in relation to follicle size and on the increase of progesterone in sheep. *Theriogenology*, v. 105, p. 184-188, 2018.

FERNANDEZ, J. et al. Effect of GnRH or hCG administration on Day 4 post insemination on reproductive performance in Merino sheep of North Patagonia. *Theriogenology*, v. 126, p. 63-67, 2019.

FIGUEIRA, L.M. et al. Colour Doppler Ultrasonography as a Tool to Assess Luteal Function in Santa Inês Ewes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 50, p.643-50, 2015

FONSECA, J. F. et al. Indução de corpo lúteo acessório em novilhas (induction of accessory corpus luteum in heifers). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 24, n. 3, p. 143-146, 2000.

FONSECA, J. F. et al. Concentraçäo plasmática de progesterona em novilhas receptoras submetidas à administraçäo de rbST, GnRH ou hCG no quinto dia do ciclo estral. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, n. 4, p. 451-458, 2001.

FONSECA, J. F. et al. Tese: Controle e perfil hormonal do ciclo estral e performance reprodutiva de cabras Alpinas e Saanen. 2002.

FONSECA, J. F. et al. Concentração plasmática de progesterona (P4) de cabras em lactação tratadas com hCG durante a estação de acasalamento natural. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, 2003.

FONSECA, J.F. et al. Desempenho reprodutivo de cabras alpinas tratadas com hCG cinco dias após o acasalamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, p. 508-513, 2005.

FONSECA, J.F. et al. Effects of hCG on progesterone concentrations and fertility in cyclic, lactating Alpine goats. *Animal Reproduction*, v. 3, p. 410-414, 2006.

FONSECA, J. F. et al. Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. *Simpósio de caprinos e ovinos da EV-UFMG*, v. 2, p. 167-194, 2007.

FONSECA, J. F.; SOUZA, J. M. G. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos. *Simpósio internacional sobre caprinos e ovinos de corte*, 2011.

GINTHER, O.J.; KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*, v. 42, p. 987-1001, 1994.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GORDON, I. Controlled Reproduction in Sheep and Goats. University Press, Cambridge, UK, 1997.

GRIFFIN, P.G.; GINTHER, O.J. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. *Journal of Animal Science*, v. 70, p. 953-972, 1992.

IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal. 2016. Available in <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm>.

KING, A.M. Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. *The Veterinary Journal*, v. 171, p. 408-420, 2006.

LÔBO, R. N. B. et al. Brazilian goat breeding programs. *Small Ruminant Research*, v. 89, p. 149–154, 2010.

LONERGAN, P. et al. Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 2, p. 66-74, 2016.

MAKRIGIANNAKIS, A. et al. The Role of HCG in Implantation: A Mini-Review of Molecular and Clinical Evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, 1305, 2017.

McCRACKEN, J.A. et al. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews*, v. 79, p. 263-304, 1999.

MEITES, J. et al. Effects of Corpora Lutea Removal and Replacement with Progesterone on Pregnancy in Goats. *Journal of Animal Science*, v. 10, p. 411-416, 1951.

MIYAMOTO, A. et al. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: new observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. *Journal of Reproduction and Development*, v. 52, p. 153–160, 2006.

MIYAMOTO, A. et al. Impact of angiogenic and innate immune systems on the corpus luteum function during its formation and maintenance in ruminants. *Biology of Reproduction*, v. 13, p. 272–78, 2013.

MIYAZAKI, T. et al. Power and colour Doppler ultrasonography for the evaluation of the vasculature of the human corpus luteum. *Human Reproduction*, v. 13, p. 2836–2841, 1998.

NASCIMENTO, A.B. et al. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 2873–82, 2013.

OLIVEIRA, M. et al. Assessing the usefulness of B-mode and colour Doppler sonography, and measurements of circulating progesterone concentrations for determining ovarian responses in superovulated ewes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 53, p. 742-750, 2018.

PUGLIESI, G. et al. Use of color Doppler ultrasonography to improve selection of higher fertility beef recipient cows for embryo transfer. *Animal Reproduction*, v. 13, p. 454, 2016.

RHIND, S. M. et al. A seasonal difference in ovine peripheral plasma prolactin and progesterone concentrations in early pregnancy and in the relationship

between the two hormones. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 52, p. 79-81, 1978.

RIZOS, D. et al. Effects of human chorionic gonadotrophin administration on Day 5 after oestrus on corpus luteum characteristics, circulating progesterone and conceptus elongation in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 24, p. 472-481, 2011.

SANGHA, G.K. et al. Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small Ruminant Research*, v. 43, n. 1, p. 53–64, 2002.

SHIRASUNA K, et al. Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 43, p. 198–211, 2012

SIMÕES, J. et al. Morphometry of ovarian structures by transrectal ultrasonography in Serrana goats. *Animal Reproduction Science*, v. 85, p. 263-273, 2005.

SIMÕES, J. et al. Assessment of luteal function by ultrasonographic appearance and measurement of corpora lutea in goats. *Animal Reproduction Science*, v. 97, p. 36–46, 2007.

SMITH, J.T. et al. Mechanisms associated with corpus luteum development. *Journal of Animal Science*, v. 72, p. 1857-1872, 1994.

SOUZA, J.M.G. et al. Autoclaved, previously used intravaginal progesterone devices induces estrus and ovulation in anestrous Toggenburg goats. *Animal Reproduction Science*, v. 129, p. 50– 55, 2011.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Frontiers in Bioscience*, v. 7, p.1879-1898, 2002.

SPENCER, T. E. et al. Conceptus-derived prostaglandins regulate gene expression in the endometrium prior to pregnancy recognition in ruminants. *Society for Reproduction and Fertility*, v.146, p. 1741–7899, 2013.

STOCCO, D.M.; CLARK, B.J. The role of the steroidogenesic acute regulatory protein in steroidogenesis. *Steroids*, v. 62, p. 29-36, 1997.

TOM, J.W.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. *Theriogenology*, v.49, p.1345-1352, 1998.

UNGERFELD, R., & RUBIANES, E. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Ruminant Research*, v. 46, p. 63–66, 2002.

VRISMAN, P. et al. Corpus luteum dynamics after ovulation induction with or without previous exposure to progesterone in prepubertal Nellore heifers. *Theriogenology*, v. 106, p. 60-68, 2018.

YI-FAN, J. et al. Ultrastructural changes of goat corpus luteum during the estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, v. 170, p. 38–50, 2016.

Anexo 1

Serviço Público Federal
Universidade Federal Fluminense
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto n° 1021, intitulado "Diagnóstico precoce de gestação utilizando a ultrassonografia com Modo B e Doppler colorido associado a um protocolo precoce de ressincronização do estro e avaliação da indução da formação de corpo lúteo acessório na contra-estação em caprinos da raça Saa", sob a orientação do Prof° Felipe Zandonadi Brandão da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 23 de novembro de 2017. A quantidade total de animais aprovada pela CEUA para este projeto foi de 320 (trezentas e vinte) cabras, e este certificado é válido por três anos após sua aprovação.

Niterói, 23 de novembro de 2017.

Fabio Otero Ascoli