

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

MÁRIO FELIPE ALVAREZ BALARO

FISIOLOGIA REPRODUTIVA EM CABRAS DA RAÇA SAANEN EM CLIMA
TROPICAL: DINÂMICA LUTEAL, ESTACIONALIDADE REPRODUTIVA E
POTENCIAL DA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA

Niterói, RJ

2016

MÁRIO FELIPE ALVAREZ BALARO

FISIOLOGIA REPRODUTIVA EM CABRAS DA RAÇA SAANEN EM CLIMA
TROPICAL: DINÂMICA LUTEAL, ESTACIONALIDADE REPRODUTIVA E
POTENCIAL DA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientador:

PROF. DR. FELIPE ZANDONADI BRANDÃO

Co-orientador:

DR. JEFERSON FERREIRA DA FONSECA

Niterói, RJ

2016

B171f Balaro, Mário Felipe Alvarez

Fisiologia reprodutiva em cabras da raça saanen em clima tropical: dinâmica luteal, estacionalidade reprodutivo e potencial da resposta superovulatória/ Mário Felipe Alvarez Balaro; orientador Felipe Zandonadi Brandão. - 2016.

155f.

Tese (Doutorado em Clínica e Reprodução Animal)- Universidade Federal Fluminense, 2016.

Orientador: Felipe Zandonadi Brandão

1. Reprodução de caprino. 2. Comportamento sexual animal. 3. Corpo Lúteo. 4. Ovário. 5. Ultrassonografia doppler. I. Título.

CDD 591.16

MÁRIO FELIPE ALVAREZ BALARO

FISIOLOGIA REPRODUTIVA EM CABRAS DA RAÇA SAANEN EM CLIMA TROPICAL:
DINÂMICA LUTEAL, ESTACIONALIDADE REPRODUTIVA E POTENCIAL DA RESPOSTA
SUPEROVULATÓRIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Aprovado em 12 de dezembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão – UFF - orientador



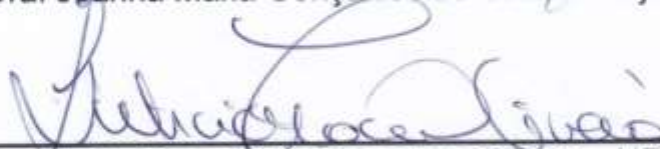
Prof. Dr. Guilherme Pugliesi - UFMG



Prof. Dr. Luciano Andrade Silva - USP



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



Profa. Dra. Letícia Zoccolaro Oliveira - UFF

Niterói, RJ

2016

*Dedico esta tese aos meus pais,
Pela educação, paciência, amor e carinho comigo e a minha profissão.*

“Existem homens que lutam um dia e são bons. Existem outros que lutam um ano e são melhores. Existem aqueles que lutam muitos anos e são muito bons. Porém, existem aqueles que lutam por toda a vida. Estes são os imprescindíveis.”

(Bertolt Brechet)

“Não pretendemos que as coisas mudem, se sempre fazemos o mesmo. A crise é a melhor benção que pode ocorrer com as pessoas e países, porque a crise traz progressos. A criatividade nasce da angústia, como o dia nasce da noite escura. É na crise que nascem as invenções, os descobrimentos e as grandes estratégias. Quem supera a crise, supera a si mesmo sem ficar ‘superado’. Quem atribui à crise seus fracassos e penúrias, violenta seu próprio talento e respeita mais os problemas do que as soluções. A verdadeira crise é a crise da incompetência... Sem crise não há desafios; sem desafios, a vida é uma rotina, uma lenta agonia. Sem crise não há mérito. É na crise que se aflora o melhor de cada um...”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela educação, carinho e dedicação em todos os momentos da minha vida. Meus irmãos e família, pelo apoio, sempre.

Aos meus irmãos e irmãs da VET-UFF: Carinne, Celso, Luís Felipe, Pedro, Raquel, Regina, Thatiana e Valéria pela amizade, apoio e parceria em todos os momentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFF pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado. E aos funcionários Sidney, Leonardo e Paula pela atenção e auxílio quando necessário.

À Embrapa Caprinos e Ovinos (Projeto 04.12.09.012.00.00) e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ pelo financiamento do projeto.

À todos os professores da graduação e pós-graduação em medicina veterinária na UFF pelos ensinamentos passados junto à atenção e seriedade no ensino público. Em especial, aos professores Felipe Brandão, Luciano Barros, Prieto Dourado, José Antônio Ribas, Robson Franco e Teófilo Pimentel. E as professoras Ana Helena, Carla Rodrigues, Elyzabeth Cardoso, Juliana Almeida, Leila Gatti, Márcia Xavier, Marta Xavier, Nádia Almosny, Nathalie Cunha, Rita Paixão e Virgínia Pereira.

Ao capril Água da Pedra, propriedade do Sr. Paulo Sérgio, e o capril Água Clara, propriedade do Sr. Caetano, pela autorização da condução dos experimentos. Aos funcionários, Zé do capril Água Clara e Valério, Wanderley, Patrícia e Fernanda do capril Água da Pedra, por toda a atenção fornecida durante o período experimental.

Aos discentes de graduação envolvidos no Grupo de Estudo, Pesquisa e Extensão em Caprinos e Ovinos – GEPECO, pelo auxílio durante o período experimental. Sem a presença fundamental de cada um (Alex, Luiz Fernando,

Ana Clara, Karina, Luiza, Loara, Juliana, Natália, Sarah, Samuel, Isabel e Marcielli), não haveria a tese aqui presente.

Aos discentes da pós-graduação e pós-docs envolvidos no Setor de Reprodução Animal, pelo apoio e auxílio pontual durante o período experimental. Em especial a: Ana Maia pela amizade, parceria e paciência ímpar na condução do experimento realizado no capril Água Clara; e a Joanna Souza-Fabjan pela amizade, parceria e aconselhamentos científicos.

Ao laboratório de Dosagem Hormonal e de Pesquisa Clínica e Molecular Marcilio Dias do Nascimento da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, em nome do prof. Dr. Felipe Brandão e da profa. Nádia Almosny, respectivamente, pela realização das dosagens hormonais e bioquímicas.

À profa. Nathalie Cunha e prof. Elmiro Rosendo, pela parceria e oportunidade de vivenciar a docência em aulas práticas, a campo, aos alunos da graduação.

À profa. Ana Helena, pela parceria, pela oportunidade de vivência na docência por meio das aulas ministradas em sua disciplina, pela eterna troca de conhecimentos, humildade e pela paixão que entrega ao tema que ministra: ovinocaprinocultura.

Ao Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca, pela coorientação no doutorado junto a todo o aprendizado vivenciado na Embrapa Gado de Leite e Embrapa Caprinos e Ovinos. Além das inúmeras viagens a campo, debate técnico, participação de eventos, companhia a congressos internacionais, atenção e disponibilização de insumos experimentais quando necessário.

À Prof^a. Elyzabeth Cardoso, minha mãe acadêmica. Só tenho a agradecer pelos conselhos, atenção, carinho e amor. Enfim, ela me ensinou que todo aprendizado deve encontrar-se intimamente associado à tomada de consciência da situação real vivida pelo educando. Hoje, eu carrego os seus ensinamentos (aprendidos aos trancos e barrancos) e me considero como uma

semente sua que cresceu, criou raízes e frutificou. Obrigado por estar presente em minha vida.

Ao prof. Felipe Brandão, pela orientação no doutorado, pelo aprendizado, conselhos e disponibilização pessoal e material sempre que necessário. Exemplo de dedicação no ensino, pesquisa e extensão, além da total entrega à Universidade Federal Fluminense. A semente que a profa. Elyzabeth plantou, foi regada intensamente pelo professor e hoje gera frutos devido a toda a sua atenção e dedicação para com tal. Obrigado por me ensinar a entender a Universidade, a lidar com situações adversas, a me ensinar a pesquisar e publicar, etc. Por fim, tenho muito orgulho e satisfação de poder participar de sua equipe de trabalho atualmente.

À Universidade Federal Fluminense, pela infraestrutura encontrada, seriedade em suas ações, apoio quando necessário dos funcionários da reitoria e, atualmente, meu local permanente de trabalho.

À Capes pela bolsa concedida no início do curso.

Por fim, a todas as pessoas aqui não citadas, mas que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional durante o período do Doutorado.

RESUMO

A partir da espécie caprina da raça Saanen manejada sobre condições tropicais, os objetivos deste estudo foram: (1) a caracterização da dinâmica luteal em fêmeas gestantes e não gestantes a partir da ultrassonografia Doppler colorido e dosagens hormonais; (2) a caracterização da estacionalidade reprodutiva em distintas ordens de parto associado à influência de fatores externos locais; (3) o teste de um protocolo de triagem hormonal para a seleção de melhores doadoras caprina de embriões. No primeiro estudo, diariamente, foram conduzidas avaliações ultrassonográficas para medição da biometria luteal e perfusão luteal junto a coletas de sangue para mensuração de progesterona em 23 fêmeas pré-sincronizadas e inseminadas. No segundo estudo, 40 fêmeas (nulíparas, primíparas e pluríparas) tiveram o sangue colhido quinzenalmente, para a mensuração de P4 e identificação de sua ciclicidade. Em associação foram coletados, em tempos pré-determinados, índices ambientais, bioquímicos, ponderais e de produção de leite. No terceiro estudo, 20 fêmeas receberam um tratamento superovulatório de triagem com eCG e 14 dias depois, um segundo tratamento com múltiplas doses de FSH. Em paralelo, foram feitas avaliações ultrassonográficas da população folicular e contagem de corpos lúteos em tempos distintos. Verificou-se, no primeiro estudo, que a avaliação da perfusão luteal foi mais fidedigna em prever a funcionalidade luteal do que a mensuração biométrica e pontos de corte foram fornecidos para se obter um CL funcional com $P4 > 1,0 \text{ ng/mL}$. No segundo estudo, constatou-se que cabras nulíparas apresentaram a estação reprodutiva no período do inverno e cabras primíparas e pluríparas no outono e inverno. A ausência do macho, durante a estação reprodutiva, foi marcada pelo aumento das ovulações sem apresentação de estro. Neste estudo, concluiu-se que o anestro estacional ocorre na primavera e as interações sociais foram capazes de restabelecer a ciclicidade em diversas fêmeas. Igualmente, índices ambientais e ponderais/metabólicos possuíram baixa e moderada influência, respectivamente, sobre o estado cíclico. No terceiro estudo, o protocolo de triagem com eCG foi eficaz na identificação de cabras Saanen com maior responsividade ao protocolo com FSH. Ademais, a aplicabilidade da avaliação ultrassonográfica do estado folicular antes de tratamentos superovulatórios a fim de identificar doadoras de alta resposta ovulatória em programas de MOET em caprinos foi confirmada.

Palavras-chave: comportamento sexual, corpo lúteo, eCG, MOET, estado ovariano, perfusão luteal, ultrassonografia doppler.

ABSTRACT

Based on the Saanen goat species managed under tropical conditions, the thesis aimed to understand: (1) the luteal dynamics in pregnant and nonpregnant goats by the US Doppler technology and hormonal assay; (2) to characterize the reproductive seasonality in different parity orders in association of the influence of local external factors; (3) to test a hormonal screening protocol to select the best embryo donors. In the first study, ultrasonographic evaluations were performed daily to measure the luteal biometry and luteal blood flow, as well blood samples were collected for P4 measurement in 23 pre-synchronized and inseminated does. In the second study, 40 females (nulliparous, primiparous and pluriparous) had the blood collected to other week for P4 measurement and identification of the cyclic status. In association, environmental, biochemical, weight and milk production indexes were collected at predetermined times. In the third study, 20 does received a superovulatory treatment of eCG and 14 days later, a second treatment with multiple doses of FSH. In parallel, ultrasound assessments of the follicular and luteal dynamics were performed at different times. In the first study, it was found that the luteal blood flow assessment was more reliable in predicting luteal functionality than biometric measurements also it provided cutoff points to indicate CL functionality ($P4 > 1.0$ ng/mL). In the second study, it was found that nulliparous goats had the reproductive season in the winter period and primiparous and pluriparous goats in autumn and winter. The buck absence, during the reproductive season, is marked by the increase of silent estrus. Seasonal anestrous occurs in the spring and social interactions were able to restore cyclicity in several females. Likewise, environmental and weight/metabolic indexes had low and moderate influence, respectively, on the cyclic status. In the third study, the eCG protocol was effective to identify Saanen goats to best response to the FSH protocol. Furthermore, the applicability of the ultrasound assessment of the follicular status before superovulatory treatments was highlighted in order to identify donors of high ovulatory response in MOET programs for goats.

Keywords: sexual behavior, corpus luteum, eCG, doppler ultrasound, MOET, ovarian status, luteal vascularization.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1 — Representação esquemática dos diferentes eventos fisiológicos no ciclo estral na cabra: padrão de desenvolvimento do folículo, ciclo ovariano e regulação do sistema endócrino. Adaptado de Fatet, Pellicer-Rubio e Leboeuf et al. (2011), p.24.
- Figura 2 — Representação gráfica da atividade esteroidogênica nas células da granulosa e da teca antes e depois da luteinização (Modificado de SANGHA, SHARMA e GURAYA, 2002), p.26.
- Figura 3 — Representação esquemática do controle neuroendócrino da atividade reprodutiva estacional em ovinos e caprinos. Os vários mecanismos foram colocados em quatro grupos que interagem entre si. Grupos (a) e (b) DC = dias curtos, DL = dias longos; Grupo (c) FB ao E2 = retroalimentação de estradiol, DA = dopamina, NA = Noradrenalina, 5HT = serotonina; Grupo (d) LCR = líquido, PMH = hipotálamo pré-mamilar, MT1 = receptor para Melatonina 1, T4 = Tiroxina, 5HT = serotonina, 5HT2A = receptor de serotonina 2A, BHE = barreira hematoencefálica, GPR54 = receptor de peptídeo Kiss. Outras: NSI = núcleo supraquiasmático, A15 = núcleo retroquiasmático do hipotálamo A15, E2 = estradiol, LH = hormônio luteinizante, FSH = hormônio folículo estimulante. Adaptado de Chemineau et al. (2010), p.43.
- Figura 4 — Representação esquemática do protocolo superovulatório “Dia 0” no início da primeira onda folicular em pequenos ruminantes (adaptado de RUBIANES E MENCHACA, 2003; retirado de MENCHACA et al., 2010). Previamente, é feito

um tratamento para a indução do estro e ovulação sincronizada. A administração de FSH começa 72-84 h após a retirada do implante, p.49.

Capítulo 2

Figure 1 — Color Doppler images from ovaries containing *corpora lutea* and luteinized-persistent follicles (LPF) throughout the 7th, 12th and 17th day of the estrus cycle in three Saanen goats, p.99.

Figure 2 — Luteal volume (VCL), luteal diameter (DCL), luteal areal (ACL), number of colored pixel (PIX), total pixel intensity (INTPIX), and subjective evaluation (SUBJ) from the greatest CL along the plasma concentration of progesterone (P4) in the luteogenesis in Saanen goats (n=20), p.100.

Figure 3 — Luteal volume (VCL), luteal diameter (DCL), luteal area (ACL), number of colored pixel (PIX), total pixel intensity (INTPIX) and subjective evaluation (SUBJ) from the greatest CL along the plasma concentration of progesterone (P4). Data were organized in the luteolysis in non-pregnant Saanen goats (n=11), p.101.

Figure 4 — Number of colored pixel (PIX), total pixel intensity (INTPIX) and subjective evaluation (SUBJ) along the plasma concentration of progesterone (P4) in the maternal recognition of pregnancy (early pregnancy) in Saanen goats (n=9), p.102.

Capítulo 3

Figura 1 — Índice pluviométrico (mm) e temperaturas máxima e mínima (°C) ao longo das estações do ano, p.115.

- Figura 2 — Comprimento da luz do dia e escuridão (horas) ao longo dos meses do ano (2015-2016) experimental, p.115.
- Figura 3 — Peso corporal, escore de condição corporal (ECC) e produção leiteira ($x \pm EP$) de cabras pluríparas, primíparas e nulíparas da raça Saanen ao longo dos meses experimentais junto à média anual, p.117.
- Figura 4 — Progesterona (P4) sérica em todos os meses do estudo (2015-2016) de cabras da raça Saanen (n=24) por: (A) ordem de parto (pluríparas, primíparas e nulíparas) e (B) todas juntas, p.118.
- Figura 5 — Frequência do estado cíclico (%) junto a presença ou ausência de comportamento sexual no rebanho durante os meses do estudo (2015-2016) em cabras pluríparas, primíparas e nulíparas da raça Saanen, p.119.
- Figura 6 — Índices bioquímicos do perfil metabólico de cabras da raça Saanen ao longo dos meses do ano (2015-2016), p.120.

Capítulo 4

- Figure 1 — Relationship between (A) the number of small follicles at first FSH dose; and (B) the number of large follicles at estrus onset in FSH treatment with the number of *corpora lutea* in goats, p.146.
- Figure 2 — Relationship between the number of *corpora lutea* in response either to eCG or FSH treatments in goats, p.147.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

- Table 1 — Coefficients of correlation and determination obtained between the luteal biometric (LB) and luteal blood flow (LBF) data with the P4 in different luteal phases in Saanen goats (n=20), p.93.
- Table 2 — Correlations obtained ($p < 0.01$) between the luteal diameter and number of colored pixels of the greatest, intermediate and smallest CL with P4 values in luteogenesis period (D0-D15) in Saanen goats (n=20), p.94.
- Table 3 — Correlations obtained ($p < 0.01$) between the luteal diameter and number of colored pixels of the smallest CL, considering it as an ovulation result or from a luteinized-persistent follicles (FPL), with the P4 values in luteogenesis of Saanen goats (n=20), p.95.
- Table 4 — Simple and multiple equations for the P4 estimation from the luteal diameter, number of colored pixel and subjective evaluation of the greatest, intermediate and smallest CL in luteogenesis in Saanen goats (n=20), p.96.
- Table 5 — Relative proportions (percentages) and number of observations of goats with P4 below and above 1.0 ng/mL for specific categories of subjective evaluation (SUBJ), number of colored pixels (NPIX), luteal diameter (DCL), luteal area (ACL) and luteal volume (VCL) with the average P4 values, p.97.

Capítulo 3

Tabela 1 — Valores absolutos (Média $\pm$ DP) dos índices bioquímicos de cabras da raça Saanen de distintas ordens de parto, p.121.

Tabela 2 — Correlações entre progesterona sobre todas as variáveis estudadas em cabras da raça Saanen de distintas ordens de parto ao longo de um ano, p.122.

Capítulo 4

Table 1 — Pearson correlations obtained per treatment (eCG/FSH) or both treatments between the number of CLs and follicular data in goats, p.144.

Table 2 — Simple and multiple linear equations to estimate the number of corpora lutea from follicular data at the beginning of superovulatory eCG and FSH treatments and at estrus onset in goats, p.145.

LISTA DE ABREVIações

%	Por cento ou porcentagem
µg	Micrograma
3β-HSD	3β-hidroxiesteroide desidrogenase
5-HT _{2A}	Receptor serotoninérgico 2 ^a
AMH	Hormônio anti-mulleriano
AMHRII	Receptor tipo II de AMH
Ang 2	Angiopietina 2
Ang II	Angiotensina II
Ang1	Angiopietina 1
ART	Tecnologias de reprodução assistida
BMP	Proteínas morfogenéticas ósseas
BMP15	Proteína morfogenética óssea 15
BMPR-1B	Receptor da proteína morfogenética óssea – 1B
CFA	Contagem de folículos antrais
cm ³	Centímetros cúbicos
E2	Estradiol
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EDN1	Endotelina-1
ESR1	Receptor endometrial de estradiol
FGA	Acetato de fluorogestona
FGF2	Fator de crescimento fibroblástico básico
FSH	Hormônio folículo estimulante
FSL	Fluxo sanguíneo luteal
G	Gramas
GDF-9	Fator de crescimento e diferenciação 9
GFBP	Proteínas de ligação do IGF
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
H	Horas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IA	Inseminação artificial

IFN α -I	Inteferon-alfa I
IFN- τ	Interferon-tau
IGFBP-4	Proteína de ligação 4 do IGF
IGFBP-5	Proteína de ligação 5 do IGF
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-8	Interleucina 8
ISG15	Gene 15 estimulado pelo interferon
Kg	Quilos
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LH	Hormônio luteinizante
LPS	Lipopolisacarídeos de <i>Escherichia coli</i>
Lyve 1	Receptor endotelial de ácido hialurônico 1
MBH	Hipotálamo mediobasal
Mg	Miligramas
MHz	Megahertz
Mm	Milímetros
mm ²	milímetros quadrados
MOET	Múltipla ovulação e transferência de embriões
MT1	Receptor de melatonina tipo 1
MV	Matéria verde
NCAM	Moléculas de adesão celular neuronal
ObRb	Receptor ovariano de leptina
ON	Óxido nítrico
OXTR	Receptor de ocitocina
P4	Progesterona
P450 _{17α}	Citocromo P450 17 α hidroxilase
P450 _{arom}	Aromatase
P450 _{scc}	Enzima de clivagem da cadeia lateral de colesterol
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGFM	13,14-di-hidro-15-ceto-PGF _{2α}
PMH	Região pré-mamilar do hipotálamo
POA	Área pré-óptica ventromedial
RNA _m	RNA mensageiro

PRCL	Regressão prematura de corpos lúteos
T4	Tiroxina
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
THX	Tireoidectomizados
UI	Unidades internacionais
US	Ultrassonografia
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular A
VEGFR1	Receptor de membrana tipo 1 para VEGF
VEGFR2	Receptor de membrana tipo 2 para VEGF
Δ_{CL}	Área luteal
$\Delta_{ovário}$	Área ovariana
<	Menor
=	Igual
>	Maior
$\geq$	Maior ou igual
$\leq$	Menor ou igual
+	Mais
$\pm$	Mais ou Menos

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	CAPÍTULO 1	22
2.1	Revisão de literatura	22
3.	JUSTIFICATIVA	74
4.	HIPÓTESES CIENTÍFICAS	76
5.	OBJETIVOS	77
5.1	Objetivo geral	77
5.2	Objetivos específicos	77
6.	CAPÍTULO 2	78
7.	CAPÍTULO 3	107
8.	CAPÍTULO 4	131
9.	CONCLUSÕES	152
10.	PERSPECTIVAS	153
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
12.	ANEXOS	155

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a caprinocultura leiteira vem se consolidando a partir de dois caminhos em áreas geográficas distintas. No Nordeste, a cadeia produtiva tem se estruturado como atividade rentável sem necessidades de grandes investimentos ou extensas áreas de criação. Em função destes motivos, a produção de caprinos é uma alternativa favorável à geração de emprego e renda no campo, principalmente por meio dos programas de fomento da agricultura familiar (HOLANDA JÚNIOR et al., 2008). Além da importância na produção de alimentos e geração de renda, os caprinos exercem o papel social por meio do fluxo regular de recursos alimentares (subsistência) às famílias do semiárido nordestino (HOLANDA JÚNIOR et al., 2006).

Já no Sudeste (principalmente nos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais) e Sul (Rio Grande do Sul), a produção de leite de cabra vem se estabelecendo, desde os anos 70. Nestes Estados, a maior parte do leite produzido tem como destino as usinas de pasteurização e/ou produção de queijos finos para um nicho de mercado com maior poder aquisitivo. De acordo com Borges (2003), apesar de dispor de apenas 3,5% do efetivo caprino do Brasil, a região destaca-se pela produção comercial (~21% do total produzido no país) e pela representatividade de seus Estados no agronegócio caprino leiteiro.

A produção de leite de cabra no Sudeste é caracterizada por sistemas de produção intensivos do tipo familiar ou por pequenos produtores (HOLANDA JÚNIOR et al., 2008). Na sua grande totalidade, localizados em pequenas áreas próximas das regiões metropolitanas e centros urbanos (BORGES, 2003). Nesses sistemas, são explorados animais de raças leiteiras especializadas, como a Saanen. Entretanto, salienta-se que há diversos fatores que vem impossibilitando a elevação da produtividade e da oferta de leite ou de carne caprina no Brasil como: o potencial genético dos rebanhos, a estacionalidade da produção, a qualidade das forrageiras tropicais, o clima, o manejo, o intervalo de partos, a idade ao primeiro parto, o controle das enfermidades, o gerenciamento dos rebanhos, a nutrição dos rebanhos, entre outros (GONÇALVES et al., 2008).

Observa-se que grande parte das deficiências impostas ao sistema produtivo pondera no âmbito reprodutivo. Neste contexto, atualmente, o Brasil se posiciona como um dos líderes na pesquisa e aplicação das tecnologias de reprodução assistida veterinária (GARCIA, 2009). Com o advento das biotecnologias reprodutivas, foi possível a utilização de novas ferramentas no processo de melhoramento animal. Tecnologias como a inseminação artificial (IA) e a ovulação múltipla e transferência de embriões (MOET), têm sido utilizadas para aumentar a prolificidade do rebanho e, conseqüentemente, a intensidade de seleção e o ganho genético (KINGHORN, VAN DER WERF e RYAN, 2006). Entretanto, o processo de MOET ainda carece de maior refinamento, pois os resultados obtidos ainda são inconsistentes pela grande variabilidade individual de resposta dos animais (BALDASSARRE, 2008).

Visando a aplicação bem-sucedida das biotecnologias apresentadas, torna-se imprescindível o conhecimento da fisiologia reprodutiva da fêmea caprina na região onde ela se encontra. Principalmente, ao se tratar de raças exóticas, como a Saanen – Suíça. Mesmo que esta raça apresente mérito genético para a produção de leite, ainda carece de pesquisas da interação destes genes com as condições ambientais encontradas no Sudeste (fenótipo = genótipo + meio ambiente).

Esta tese pretende trazer a luz da comunidade científica o estudo e discussão de distintos tópicos na fisiologia reprodutiva de cabras da raça Saanen sob as condições tropicais impostas na região Sudeste. Espera-se: (1) compreender a fisiologia pertencente a dinâmica luteal durante a estação reprodutiva em cabras não gestantes e no início da gestação; (2) caracterizar a estacionalidade reprodutiva na raça e a sua interação com a ordem de parto e outros fatores externos e (3) propor uma metodologia para identificação de fêmeas mais responsivas ao estímulo superovulatório em programas de MOET.

2. CAPÍTULO 1

2.1 Revisão de literatura

Os caprinos são importantes contribuintes na produção global de alimentos e na produção de fibra têxtil. No constante crescimento da população mundial, estes possuem um enfático papel, principalmente para as economias dos países em desenvolvimento, e, em particular, para aqueles com condições climáticas adversas, ou em terras sub-férteis. A constatação da reprodução estacional nas principais raças leiteiras promoveu a adaptação de tecnologias de reprodução assistida (ART), como protocolos hormonais para controle do estro e/ou ovulação, IA e MOET, visando melhorar os ganhos genéticos e produtivos nestas raças (AMIRIDIS et al., 2012). Neste contexto, torna-se imprescindível o conhecimento da fisiologia reprodutiva da fêmea caprina, e suas particularidades, para que se obtenha sucesso nos mais variados sistemas de produção tropical adotados na pecuária brasileira. Ademais, na busca de se obter melhores resultados no emprego das ART em caprinos.

2.1.1 *Ciclo estral na espécie caprina*

O ciclo estral das raças caprinas de interesse comercial é orquestrado pela estacionalidade reprodutiva em associação a diversos fatores ambientais e de manejo zootécnico (latitude, clima, nutrição, raça e manejo reprodutivo) (FATET, PELLICER-RUBIO e LEBOEUF, 2011). O fato da atividade ovulatória sofrer influência estacional, afeta a oferta de produtos caprinos ao longo do ano e torna-se um desafio aos produtores que almejam ter uma produção anual constante.

As principais raças leiteiras, Saanen, Alpina e Toggenburg, são consideradas como poliéstricas estacionais, ou seja, apresentam diversos ciclos estrais durante determinada época do ano (MOUCHEREK e MOULIN, 1987). O ciclo estral, por sua vez, consiste de modificações temporais morfológicas e fisiológicas nos ovários e trato genital feminino. O comprimento do ciclo estral é definido como o intervalo entre duas manifestações de estro ou ovulações sucessivas. Embora a duração média do ciclo estral na cabra seja

de 21 dias, o seu comprimento varia conforme raça, idade, localidade, nutrição e época do ano (FATET, PELLICER-RUBIO E LEBOEUF, 2011). Lopes Junior et al. (2001) demonstraram a variação no comprimento do ciclo estral em cabras Saanen no período de um ano em que houve 12,0% de ciclos curtos (<17 dias), 50,3% dos ciclos normais (17-25 dias) e 37,7% dos ciclos longos (> 25 dias). Rivera et al. (2003) demonstraram maior proporção de ciclos anormais (curtos ou longos) no início e no final da estação reprodutiva. Já Cerbito et al. (1995) associaram o fato ao efeito macho ou a períodos mais chuvosos.

Em meados da década de 90, Ginther e Kot (1994) trouxeram um grande avanço no estudo da dinâmica folicular em cabras ao demonstrar, pela ultrassonografia (US), que o crescimento folicular transcorria em forma de onda ao longo do ciclo estral. Por sua vez, na revisão de Driancourt (2001), foi descrita a sequência de três eventos (recrutamento, seleção e dominância) que englobavam a dinâmica folicular em bovinos, ovinos e equinos. Na sequência, pesquisas expressaram o número médio de ondas existentes (~3-4) durante o ciclo estral (EVANS, 2003; SIMÕES et al., 2006). Nestas ondas, a penúltima e a última poderiam fornecer os folículos ovulatórios em ovelhas (GINTHER e KOT, 1994; BARTLEWSKI, BABY e GIFFIN, 2011).

A partir dos conhecimentos gerais expressados acima, podemos, didaticamente, dividir dois importantes eventos ovarianos que ocorrem durante o ciclo estral: a dinâmica folicular e luteal. A dinâmica luteal influencia na foliculogênese e segrega o ciclo estral na chamada fase luteal (progesterônica) e folicular (estrogênica) (FATET, PELLICER-RUBIO e LEBOEUF, 2011).

Brevemente, a fase lútea começa a partir do momento da ovulação. É dividida em metaestro, quando ocorre a luteinização das células foliculares em células luteais junto a elevação das concentrações de progesterona (P4), e diestro, quando as concentrações periféricas de P4 estão estabilizadas até o início da luteólise (FATET, PELLICER-RUBIO E LEBOEUF, 2011). Por meio da Figura 1, demonstra-se um compilado ilustrativo do ciclo estral em caprinos.

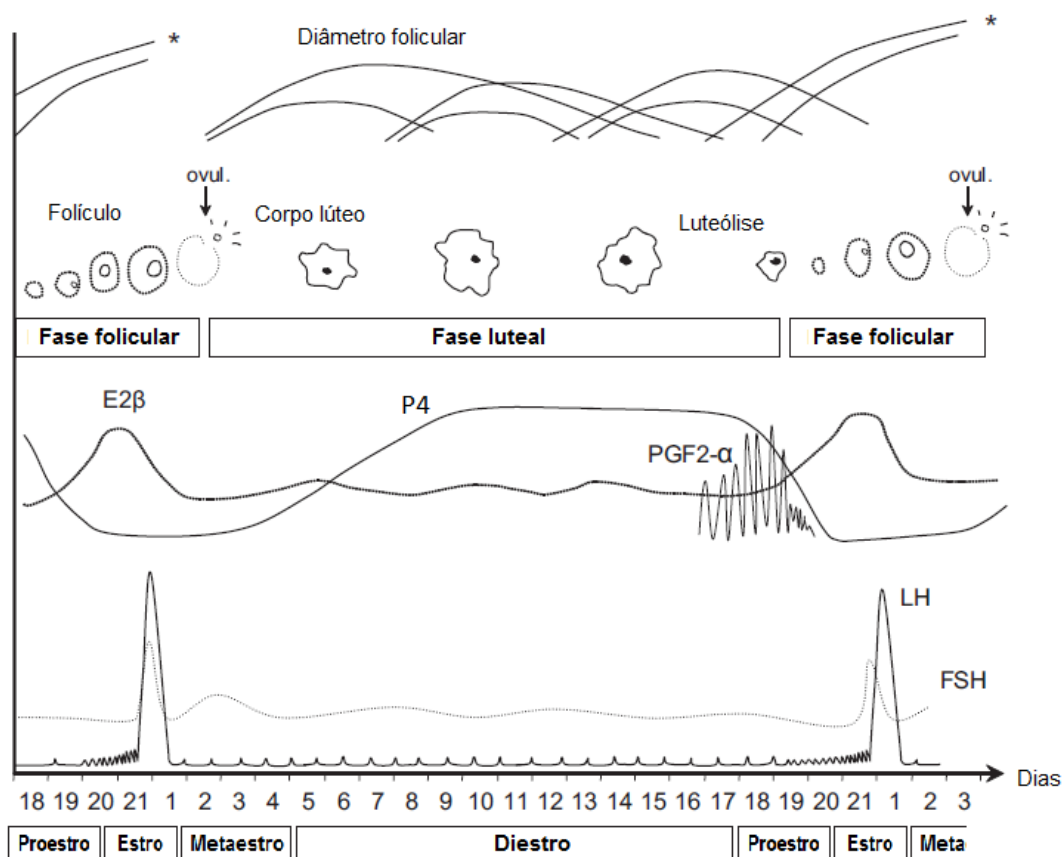


Figura 1. Representação esquemática dos diferentes eventos fisiológicos no ciclo estral na cabra: padrão de desenvolvimento do folículo, ciclo ovariano e regulação do sistema endócrino. Adaptado de Fatet, Pellicer-Rubio e Leboeuf et al. (2011).

2.1.1.1 Dinâmica luteal

O CL é uma glândula endócrina transitória. É formado a partir da parede do folículo pré-ovulatório, após a liberação do oócito, por um complexo mecanismo envolvendo mudanças morfológicas e bioquímicas. A glândula demonstra variações em tamanho, estrutura e atividade esteroidogênica de acordo com os diferentes estágios do ciclo estral e gestação (FIELDS e FIELDS, 1996). Consiste basicamente de dois tipos de células luteais, as grandes e as pequenas, oriundas das células da teca e granulosa, além de apresentar células endoteliais, pericitos, células da musculatura lisa, macrófagos, leucócitos e plasmócitos (ALILA e HANSEL, 1984). O CL secreta

P4 como principal hormônio esteroide e pequenas quantidades de E2, prostaglandinas e hormônios peptídeos como relaxina, ocitocina, vasopressina e inibina (FIELDS, 1991).

2.1.1.2 Produção de progesterona (P4) e luteogênese

A biossíntese de hormônios esteroides é modulada pela disponibilidade de colesterol e a expressão gênica de enzimas esteroidogênicas específicas (STOCCO e CLARK, 1997). A onda pré-ovulatória de LH inicia diversas mudanças na expressão e regulação das enzimas esteroides e é a chave para o processo de luteinização (GURAYA, 2000). Logo após a onda de LH, é observada uma queda drástica na expressão de genes que codificam a Citocromo P450 17 α hidroxilase (P450_{17 α}) e aromatase (P450_{arom}), responsáveis pela produção de E2 (SMITH, MCINTUSH e SMITH, 1994). Em paralelo, é evidenciada a maior expressão enzimática de 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD) pelas células da granulosa e aumento desta atividade enzimática no CL com desfecho nas elevações de P4 (HAY e MOOR, 1975). Além disso, os RNA_m que codificam a enzima de clivagem da cadeia lateral de colesterol (P450_{scc}) estariam presentes em todos os estágios de vida do CL (RODGERS et al., 1986) convertendo colesterol em pregnenolona, matéria-prima para produção da P4 pela 3 β -HSD (Figura 2). Acredita-se que cerca de 80% da P4 produzida *in vivo* pelo CL de ovino venha de células lúteas grandes (NISWENDER et al., 1985).

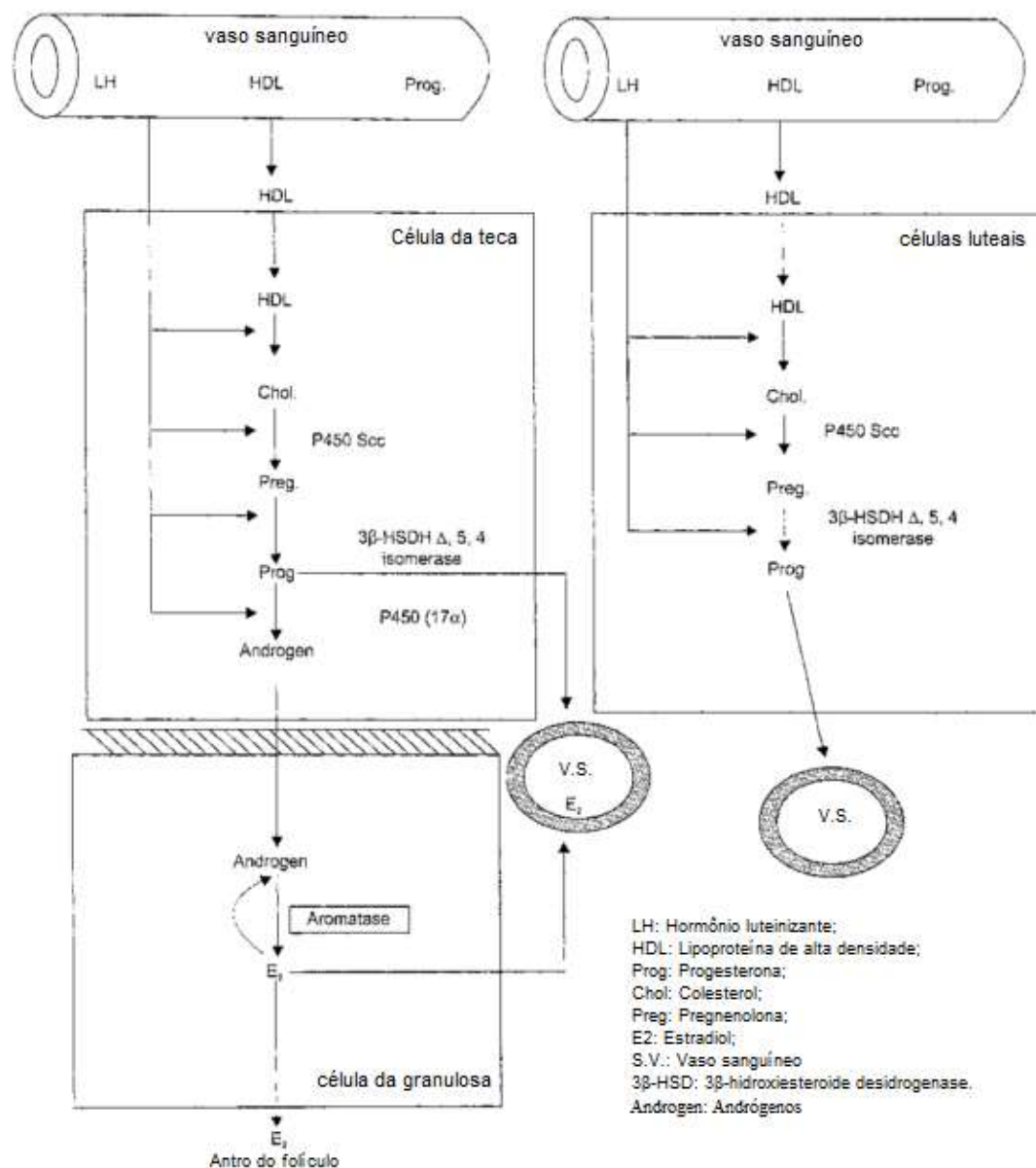


Figura 2. Representação gráfica da atividade esteroidogênica nas células da granulosa e da teca antes e depois da luteinização (Modificado de SANGHA, SHARMA e GURAYA, 2002).

O CL é uma glândula altamente vascularizada cuja densidade vascular excede a maioria dos tumores. Uma vez formada, a perfusão é mantida durante um período de tempo limitado no caso da não gestação. Caso a gestação ocorra, a manutenção dos vasos sanguíneos no CL é necessária durante um período mais prolongado visando à produção de P4 para a perpetuação da gestação. Assim, os vasos sanguíneos e células endoteliais do

CL desempenham um papel essencial na função lútea. Paralelamente, o sistema imunológico contribui para a regulação da função ovariana. Em particular, os leucócitos e suas citocinas têm sido implicados na regulação da esteroidogênese, assim como na função vascular. O CL tem mecanismos bem delineados pelo qual o seu desenvolvimento, manutenção e regressão sejam eficazmente controlados, não só através da regulação hormonal, mas também pelo sistema vascular e imunológico (SHIRASUNA et al., 2012; MIYAMOTO et al., 2013).

Na cabra, o CL possui um grande número de células endoteliais vasculares, sendo estas responsáveis por até 50% da celularidade luteal. Já as células lúteas grandes e pequenas constituem cerca de 10 e 25%, respectivamente, de todas as células do CL (SHARMA e SHARMA, 1998). Funcionalmente, os vasos sanguíneos luteais são classificados em dois tipos: (1) os vasos arteriolovenosos (~40 μ m) e venosos (~30 μ m), que possuem uma camada de musculatura lisa; e (2) os vasos capilares, sem camada de músculo liso. Nos CL de bovinos e ovinos, o número de vasos arteriolovenosos e microcapilares aumenta drasticamente do início ao meio da fase lútea (BAUER, SCHILLING e SPANEL-BOROWSKI, 2003; HOJO et al., 2009; SHIRASUNA et al., 2010). Sendo este, um indicativo da angiogênese ativa durante vários dias após a ovulação.

O CL possui produção ativa de diversos fatores angiogênicos que corroboram com a sua intensa perfusão. É citado o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) e o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF2) dentre os principais fatores que regulam a angiogênese (CONNOLLY, 1991; FERRARA e DAVIS-SMYTH, 1997). O VEGFA (junto ao seu receptor VEGFR-2) e o FGF2 (junto aos seus receptores) possuem maior expressão durante a fase luteal precoce com subsequente diminuição durante a fase lútea média até a regressão (SCHAMS et al., 1994; BERISHA et al., 2000). Tem sido demonstrado o papel do VEGFA e FGF2 no estímulo a produção de P4 (MIYAMOTO et al., 1992; KOBAYASHI et al., 2001) e na formação da extensa rede de células endoteliais ao redor do CL (ROBINSON et al., 2008). Woad et al. (2009) ao utilizarem tratamentos com inibidores de VEGFR2 sob o CL, *in vitro*, observaram um decréscimo de 60% das redes de células endoteliais em comparação com o controle. Em adição, ao aplicarem inibidores de FGFR1,

sob a presença fisiológica de VEGFA, constataram a redução de 90% nas redes endoteliais. Assim, foi sugerido que o FGF2 é mais importante que o VEGFA na formação das redes lúteas vasculares (WOAD et al., 2009). Outrossim, o FGF2 parece desempenhar um papel-chave na iniciação da angiogênese luteal inicial. Em roedores, a administração de anticorpos anti-VEGFR2 no período de implantação embrionária, resultou no decréscimo do tamanho luteal, vasos sanguíneos e concentrações de P4, além da indução a apoptose e perda embrionária (PAULI et al., 2005). Resultados similares foram demonstrados por Yamashita et al. (2008) em que a supressão de VEGFA e FGF2 culminou com a queda na produção de P4, supressão do volume luteal e alterações na expressão de RNA_m angiogênicos (VEGFA, FGF2 e angiopoetinas).

Na esfera nutricional, a leptina, marcador hormonal do metabolismo, também possuiria ação endócrina sobre o desempenho do CL. Wiles et al. (2014) demonstraram que a leptina estimula, por meio de seu receptor ovariano (ObRb) a expressão de angiopoietina 1 (Ang1), VEGF e FGF2 nos estádios iniciais de formação do tecido luteal. Em adição, Al-Azraqi (2007) associou a disfunção luteal e baixa produção de P4 a concentrações inferiores de leptina quando as cabras foram mantidas em jejum no período de formação luteal. Em conhecimento que o jejum provavelmente restringiu o acesso de precursores esteroides ao tecido luteal, os achados das pesquisas acima se agregam no contexto da influência da leptina sobre o processo angiogênico inicial do CL e bom desempenho posterior da glândula.

No âmbito do sistema imune, em estudo recente, Turner et al. (2011) ao bloquearem a ação macrofágica, constataram um aumento na hemorragia ovariana acompanhado pela depleção de células endoteliais. Demonstrou-se que a retirada dos macrófagos interferiu na interação entre pericitos e endotélio, resultando na disfunção endotelial. Em adição, foi demonstrado que o VEGFA poderia atuar como quimiotático para macrófagos (CURSIEFEN et al., 2004). Assim, o macrófago parece desempenhar um papel ímpar na neovascularização luteal. Outro estudo apresentado por Jientaweeboon et al. (2011) relatou um número considerável de neutrófilos e uma elevada concentração de interleucinas 8 (IL-8, quimiotático específico de neutrófilos) no CL de vacas durante a fase luteal inicial (1-4 dia do ciclo estral). Ao realizar o

experimento *in vitro*, os autores descobriram que a migração de neutrófilos para a formação lútea inicial poderia estar relacionada com o fato da IL-8 estimular a formação de estruturas tipo capilar oriunda de células endoteliais do CL. Ademais, já havia sido relatada a capacidade de neutrófilos e da IL-8 na indução da angiogênese *in vivo* (GOTO et al., 2002). Deste modo, tem sido sugerida a participação dos neutrófilos e a IL-8 não só na indução da inflamação tecidual e cicatrização de feridas, como também na regulação da angiogênese do CL em desenvolvimento.

2.1.1.3 Luteólise

A luteólise consiste na perda da capacidade esteroidegênica (luteólise funcional) e a regressão morfológica (luteólise estrutural) do corpo lúteo (McCRACKEN et al., 1999). No processo de regressão do CL, a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) derivada do sistema de contracorrente vascular uterino, inicia a cascata luteolítica e rapidamente reduz a secreção de P4 luteal. Tem sido reportado um incremento no fluxo de sangue luteal logo após a ação exógena ou endógena da $PGF_{2\alpha}$ em bovinos (MIYAMOTO et al., 2005; SHIRASUNA et al., 2008). Em CL maduros, a administração de $PGF_{2\alpha}$ induziria o incremento no fluxo de sangue luteal periférico com o aumento da P4 e mudanças na concentração de LH seguido pela queda gradual do fluxo de sangue luteal. O óxido nítrico (ON) é um potente vasodilatador e tem sido reportado na inibição da secreção de P4 e na indução da apoptose em células luteais de bovinos (SKARZYNSKI et al., 2003). Em vacas, a injeção de $PGF_{2\alpha}$ estimularia a expressão de NO-sintase endotelial (eNOS) em CL maduros, nos trinta minutos seguintes a aplicação, que seria acompanhada pelo aumento transitório no fluxo de sangue luteal. Já a aplicação de inibidores do ON retardaria a luteólise (SHIRASUNA et al., 2008). Berisha, Meyer e Schams (2010) e Shirasuna et al. (2010) descreveram uma queda significativa nas concentrações de VEGFA após aplicação de $PGF_{2\alpha}$. A partir deste resultado, também foi considerado o papel da $PGF_{2\alpha}$ como um inibidor da angiogênese, regulando negativamente a expressão de RNA_m para VEGFA. Em adição, a $PGF_{2\alpha}$ estimularia a biosíntese de fortes fatores vasoconstritores como a endotelina-1 (EDN1) e angiotensina II (Ang II) envolvidas na inibição da secreção de P4 e luteólise (HAYASHI e

MIYAMOTO, 1999; HINCKLEY e MILVAE, 2001). A partir do restrospecto discutido, o efeito luteolítico da $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode ser sumarizado pela indução da angiólise e vasoconstrição que culminaria com a limitação de oxigênio, hipóxia e morte celular.

2.1.1.4 Corpo lúteo no início da gestação

Quando a gestação é estabelecida, ocorrem mudanças na estrutura do CL. De modo geral, o grau de perfusão é mantido ao longo da fase lútea tardia até o início da prenhez devido à perpetuação na expressão de VEGFA e diminuição da Angiopietina 1 (Ang 1) e angiopietina 2 (Ang 2) (ocasionam instabilidade vascular). Em contrapartida, ocorre uma diminuição drástica nos pericitos e células musculares lisas (BEINDORFF et al., 2010). Lei, Chegini e Rao (1991) relataram que o tamanho médio das células não luteais, dentro do CL, não se alteram durante o ciclo estral, mas diminuem no CL da prenhez precoce.

O sistema linfático é essencial para a manutenção do equilíbrio de pressão do fluido intersticial, na resposta imunológica e no transporte de proteínas e células, principalmente leucócitos (WANG e OLIVER, 2010). Novos estudos vêm demonstrando a relação do sistema linfático e imunológico com o CL gravídico. Recentemente, verificou-se que a expressão do receptor endotelial de ácido hialurônico 1 (Lyve 1), um marcador de vasos linfáticos, apresentou-se elevado aos 40 dias de gestação. Além disso, os níveis de RNA_m para fatores linfangiogênicos como VEGFC e Lyve 1 estavam aumentados no CL aos 16 dias de gestação. Assim, foi sugerido que o sistema linfático, e não o sistema vascular sanguíneo, do CL bovino é reconstituído durante o início da prenhez (NITTA et al., 2011). Em adição, verificou-se que o tratamento com Interferon-tau ($\text{IFN-}\tau$) purificado sobre os vasos linfáticos da região ilíaca interna, *in vitro*, estimularia a proliferação de células linfáticas endoteliais e a formação de redes tipo capilar (NITTA et al., 2011). Assim, o sistema linfático pode desempenhar papéis fisiológicos ainda não esclarecidos no desenvolvimento e perpetuação do CL em fêmeas prenhas. Interessantemente, já havia sido declarado por Hein et al. (1988) que a concentração de P4 seria superior nos vasos linfáticos ovarianos quando

comparada aos vasos linfáticos do útero ou a veia ovariana, durante todas as fases da gestação em bovinos.

Em ruminantes domésticos, o conceito produz IFN- τ como um fator de reconhecimento materno. Este fator atuaria no útero e consequentemente, o receptor de ocitocina (OXTR), culminando com a interrupção da liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$. O mecanismo descrito resulta na manutenção da gestação e perpetuação do CL (IMAKAWA et al., 1987; HANSEN et al., 2010). Um conjunto de pesquisas recentes tem elucidado as novas funções do IFN- τ . Inicialmente, foi verificado que o IFN- τ , produzido pelo conceito, atravessaria o lúmen uterino e entraria na veia uterina (OLIVEIRA et al., 2008). Além disso, o IFN- τ regularia a expressão do gene 15 estimulado pelo interferon (ISG15), tanto no endométrio quanto no CL de ovelhas e vacas gestantes (GIFFORD et al., 2007; YANG et al., 2010). Esta expressão diferencial indicaria algum grau de comunicação do IFN- τ (via sistema veia uterina/artéria ovariana) para o ovário durante a prenhez (BOTT et al., 2010). Hansen et al. (2010) descreveram que o IFN- τ ainda exerceria efeitos endócrinos no CL por meio da indução de resistência do mesmo a $\text{PGF}_{2\alpha}$, contribuindo para a sobrevivência em longo prazo da glândula. Estes resultados indicam que o IFN- τ pode desempenhar um papel crucial na transformação do CL cíclico para CL gestacional em ruminantes.

2.1.2 Uso da ultrassonografia na elucidação da fisiologia luteal

A ultrassonografia (US) tem sido aplicada ao trato reprodutivo de animais domésticos desde os anos 80 (PALMER E DRIANCOURT, 1980) e estabelecida como uma ferramenta prática para animais de produção a partir da década de 90. Com o advento desta técnica, foi possível detectar gestações em estágios precoces e caracterizar, em tempo real, a dinâmica folicular, ovulação e corpo lúteo. Essas descobertas auxiliaram na compreensão da fisiologia ovariana e fomentaram o estudo de diversos protocolos hormonais nos dias de hoje (MIYAMOTO et al., 2006).

2.1.2.1 Ultrassonografia modo-B

A caracterização ultrassonográfica do CL durante o ciclo estral e gestação em ruminantes foi realizada pela primeira vez em vacas na década de 80 (KITO et al., 1986; PIERSON e GINTHER, 1987; KASTELIC et al., 1990). Os achados auxiliaram na interpretação dos valores plasmáticos de P4 durante o ciclo estral, já conhecidos desde meados da década de 60 (HEAP e LINZELL, 1966; THORBURN e SCHNEIDER, 1972). A partir da década de 90, o uso seriado da US transretal possibilitou o início de estudos visando à compreensão morfofuncional do CL (DE CASTRO et al., 1999; SIMÕES et al., 2005) incluindo a sua relação com os níveis de P4 (MEDAN et al., 2003).

Os primeiros avanços significativos na interpretação ultrassonográfica, modo-B, do CL em caprinos foram feitos por Simões et al. (2007) elucidando: (1) a caracterização de duas imagens ultrassonográficas modo-B distintas, (a) CL com contorno irregular e ecotextura heterogênea (fase de amadurecimento e luteólise – metaestro, final de diestro/proestro) e (b) CL com contorno regular e ecotextura granular (fase madura – meio do diestro); (2) o número e diâmetro (mm) dos CL (cavitários ou não) ao longo do ciclo estral e a sua relação com a concentração de P4. Posteriormente, Arashiro et al. (2010b) demonstraram a correlação temporal da luteogênese e luteólise junto a interface da P4 ($r=0,63$ e $r=0,50$, respectivamente; $P<0,05$). Os autores também propuseram a análise computacional de pixels na interpretação da ecotextura luteal como uma ferramenta para avaliar a produção de P4 pelo CL (ARASHIRO et al., 2010a).

Apesar do grande potencial de aplicação desta ferramenta, esta é uma linha de pesquisa ainda incipiente, particularmente em pequenos ruminantes, nos quais é demonstrada a US como uma prática e eficiente ferramenta de estudo e compreensão da função luteal.

2.1.2.2 Ultrassonografia modo-Doppler

A US com Doppler colorido começou a ser utilizada há três décadas para analisar de forma não invasiva a circulação sanguínea do CL em mulheres (BABER et al., 1988; BOURNE et al., 1996). Por meio esta técnica, foram detectadas diferenças inter-individuais no fluxo sanguíneo luteal (FSL) e

concluiu-se que a US Doppler poderia auxiliar na elucidação de distúrbios luteais na mulher (MIYAZAKI et al., 1998). A partir da metodologia Doppler descrita por Miyazaki et al. (1998), começaram os primeiros estudos na medicina veterinária em ruminantes.

Ressalta-se que existem dois *modus operandi* disponíveis na tecnologia Doppler. O Doppler colorido (*color flow*) mede a velocidade do fluxo sanguíneo indo em direção ou contra o transdutor. Em contraste, o Power Doppler detecta a intensidade de energia no fluxo de sangue. As células do sangue são visualizadas como focos coloridos projetados sobre a imagem em modo B (Ginther, 2007). Comparado com a técnica Doppler fluxo de cor, o Power Doppler é mais indicado para a imagiologia de baixa perfusão sanguínea (BUDE, RUBIN e ADLER, 1994). Todavia, a técnica ainda não é suficientemente sensível para detectar a perfusão de vasos pequenos no centro do CL. Portanto, nas imagens em Power Doppler do CL, apenas o fluxo sanguíneo de vasos maiores é perceptível.

Uma vez que não é possível quantificar o fluxo de sangue no Power Doppler, as imagens obtidas são digitalizadas e o número de pixels de cor ou a área colorida dentro do CL são mensurados por meio de sistemas de análise de imagem assistida por computador e utilizados como parâmetros semiquantitativos para a avaliação da perfusão luteal. Tem sido demonstrado que esta metodologia possui alta reprodutibilidade intra-observador na determinação da perfusão luteal. Bollwein et al. (2002) relataram que o coeficiente de correlação intraclasse para o número de pixels de cor de três imagens CL gravadas durante um período de exame foi de 0,90, ou seja, de excelente repetibilidade.

Nos primeiros estudos a partir da tecnologia Doppler, Acosta et al. (2003) demonstraram o incremento no fluxo de sangue na teca externa de folículos maduros e sua associação com o pico de LH e ovulação em bovinos. A partir desta observação, foi possível distinguir folículos pré-ovulatórios saudáveis (intenso fluxo de sangue periférico) dos anovulatórios ou atresícos (ausência de fluxo sanguíneo). Ademais, possibilitou-se o discernimento entre o cisto folicular avascularizado, do cisto luteal, vascularizado. Na sequência, Acosta et al. (2005) indicaram que um grupo de folículos pequenos (<2,5 mm), em recrutamento, detinha fluxos de sangue similares e com o decorrer da

seleção e dominância, os que apresentavam fluxo sanguíneo mais intenso prosperavam sobre os demais até a ovulação em bovinos. No CL jovem, o fluxo sanguíneo (área e velocidade) aumentava em paralelo com a concentração de P4 e o volume do CL, indicando angiogênese ativa e o normal desenvolvimento luteal (ACOSTA et al., 2003). El-Sherry, Matsui e Miyake (2010) ao trabalharem com vacas superovuladas, relataram achados em concordância com o estudo de Acosta et al. (2003). Folículos maduros mais vascularizados obtiveram maior sucesso ovulatório quando comparado aos folículos pouco vascularizados. Estes últimos evoluíram para atresia ou formação de cistos luteais. Recentemente, Oliveira et al. (2014) indicaram uma correlação significativa negativa entre o fluxo vascular de folículos pré-ovulatórios e o número de estruturas não fertilizadas coletadas em ovelhas superovuladas.

Na proximidade da luteólise (17^o-18^o dia do ciclo estral), demonstrou-se que a perfusão do CL aumentava acompanhada da queda nas concentrações de P4 no dia seguinte em bovinos (SHIRASUNA et al., 2004; MIYAMOTO et al., 2005; GINTHER et al., 2007). Neste contexto, acusou-se a liberação pulsátil de PGF_{2α} pelo útero, nesta fase, como a responsável pelo maior influxo sanguíneo luteal. Em teoria, a liberação de PGF_{2α} pelo útero estimularia a produção de NO nas arteríolas periféricas do CL maduro, ocasionando uma vasodilatação e desencadeamento da cascata luteolítica e queda na P4. Em experimento prévio, Acosta et al. (2002) auxiliaram na interpretação dos achados acima. A partir da aplicação de um análogo da PGF_{2α} em um CL maduro e outro jovem de bovino, foi constatado que o fluxo sanguíneo ao redor do CL maduro aumentou após 30 minutos da dosificação e perpetuou até duas horas, seguido pela queda vascular gradual. Já o CL jovem não respondeu a dose, prosseguindo o seu desenvolvimento e corroborando a teoria da insensibilidade luteal a PGF nesta fase inicial. Ginther et al. (2007) e, mais recente, Shrestha et al. (2011) também descreveram um aumento imediato do FSL após a infusão intra-uterina de 13,14-di-hidro-15-ceto-PGF_{2α} (PGFM) em bovinos.

A luteólise induzida por fármacos também foi demonstrada em ovinos por El-Sherry et al. (2013). Neste estudo, objetivou-se averiguar os distintos efeitos do dinoprost (12,5 mg) e cloprostenol (250 µg) sobre o FSL e a

regressão luteal. Após aplicação, o FSL do Grupo_{dinoprost} aumentou significativamente na meia-hora seguinte. Já no Grupo_{cloprostenol} sucedeu a diminuição do FSL. Especulou-se que o dinoprost ocasionaria um rápido aumento nos níveis de NO, na primeira hora após a aplicação, com efeitos citotóxicos deletérios para as células lúteas. Em contraste, o cloprostenol diminuiria os níveis de NO, causando vasoconstrição transitória e hipóxia luteal subsequente.

Herzog et al. (2010) correlacionaram o tamanho (modo-B) e FSL (Power Doppler) com as concentrações de P4 durante o ciclo estral de vacas. Foi verificada uma alta correlação positiva entre o FSL e a P4. Além disso, as mudanças cíclicas no tamanho luteal também foram correlacionadas ao FSL e a P4, porém em menor grau. A partir da estreita correlação entre o FSL e a P4 foi enfatizada a importância do bom abastecimento de sangue como condição *sine qua non* para a boa produção de P4. Sumarizando as bases fisiológicas, o sangue fornece precursores de esteroides e gonadotrofinas (JANSON, DAMBER e AXEN, 1981) e a maioria das células esteroidogênicas do CL encontram-se em estreito contato com os capilares (REYNOLDS, KILLIELEA e REDMER, 1992).

De acordo com Acosta et al. (2002), o fluxo de sangue para o CL é essencial para a secreção de P4 na circulação. Em adição, foi constatado que durante a fase lútea estática, o tamanho luteal permaneceu constante enquanto que houve o aumento do FSL e P4. Estes resultados são corroborados por um estudo histológico anterior em CL de bovinos em que foi demonstrado o aumento no espaço vascular (~25%) entre os dias 6 e 12 do ciclo estral. Enquanto que as células não lúteas (ex.: musculatura lisa) diminuíram ao longo deste período em 15% (LEI, CHEGINI e RAO, 1991). Assim, o aumento do FSL parece ser ocasionado predominantemente pela vasodilatação das arteríolas existentes e não pela maior perfusão entre os dias 6 e 12 do ciclo estral. Por fim, Herzog et al. (2010) ainda descreveram que na luteólise, a descida acentuada do FSL limitaria a disponibilidade de precursores esteroides e colaboraria na queda da P4 pelas células lúteas restantes. Na espécie ovina, Figueira et al. (2015) relataram, recentemente, uma correlação significativa entre o FSL e a produção de P4 durante a luteogênese ($r = 0,22$) e luteólise ($r = 0,48$). Estes resultados vêm a corroborar que, possivelmente, os pequenos

ruminantes possuem um padrão vascular luteal e relação com a P4 em similaridade aos encontrados previamente em bovinos.

O FSL também vem sendo utilizado na elucidação dos eventos iniciais da gestação. Em um estudo recente por Herzog et al. (2011), avaliou-se o FSL em três grupos de vacas: (1) prenhas (confirmação do embrião no dia 25); (2) não-prenhas (intervalo entre estros de 15-21 dias); ou (3) perda embrionária precoce (intervalo entre estros de 25 dias). Objetivou-se determinar o valor preditivo do FSL como um método para o diagnóstico precoce da prenhez ou da perda embrionária. O FSL foi significativamente maior a partir da 3ª semana após a ovulação em fêmeas gestantes quando comparado as não gestantes (mesmos achados de UTT, JOHNSON e BEAL, 2009; PUGLIESI et al., 2014). Entre os dias 15-18 pós ovulatórios, foram detectadas diferenças visuais e numéricas, pelo número de pixel, no FSL entre vacas gestantes ou com perda embrionária precoce. Porém, a diferença significativa no FSL apenas foi detectada aos 19 dias após a ovulação. Os autores enfatizaram que não houve alteração nas concentrações de P4 entre esses grupos e o FSL poderia ser uma ferramenta mais sensível na detecção da perda embrionária. Como o período crítico para o estabelecimento da gestação em bovinos ocorre entre 15 a 17 dias da gestação (WOLF et al., 2003), o incremento no FSL poderia estar relacionado ao aumento na transferência do sinal embrionário para a manutenção do CL e reconhecimento materno da gestação. A partir de estudos em búfalas, constatou-se que as fêmeas que ficaram prenhas possuíam maior taxa de crescimento do CL (diâmetro e área) entre os dias 5 e 10, após ovulação, quando comparado as não prenhas (VECCHIO et al., 2012). Os autores atribuíram esse maior desenvolvimento ao suporte angiogênico da estrutural luteal que apresentou maior FSL no dia 10 da gestação.

A avaliação do FSL também vem sendo adotada na interpretação de respostas biológicas frente a diferentes protocolos hormonais. Beindorff et al. (2009) ao investigarem o efeito da gonadotrofina coriônica humana (hCG), aplicada no sétimo dia após a ovulação, verificaram aumento transitório no FSL, 1h após a aplicação da gonadotrofina. Houve o retorno aos níveis basais de FSL na sequência e elevação das concentrações de P4 nos dias seguintes. Bollwein et al. (2010) relataram diminuição do FSL, sem afetar o tamanho de CL ou a produção de P4, em casos onde a fase pré-ovulatória foi encurtada

pela aplicação de GnRH. Recentemente, Garcia-Ispuerto e Lopez-Gatius (2012) relataram que suplementação exógena de P4 (por 14 dias) no dia 5, após a inseminação, reduziria o FSL entre os Dias 7-12 pós-IA em vacas. Estes autores especularam que a redução na perfusão luteal poderia ser a responsável pelo não incremento na fertilidade dos animais.

Estudos no âmbito de processos inflamatórios sistêmicos sobre a funcionalidade do CL foram demonstrados por Herzog et al. (2012). Segundo os autores, após a infusão venosa de lipopolisacarídeos de *Escherichia coli* (LPS), houve diminuições transitórias no FSL e tamanho luteal que perpetuaram por 48-72 h. A P4 também reduziu nas primeiras 24h após o tratamento. Foi suposto que o menor FSL tenha sido decorrente da redistribuição venosa periférica para o centro, conforme descrito anteriormente por Richardson et al. (1996). Além disso, foi discutido que os LPS possuiriam ação endotóxica e colaborariam com o aumento da permeabilidade capilar, danos no endotélio e liberação de compostos vasoativos que iniciariam a cascata de coagulação.

É perceptível a multidisciplinariedade de resultados obtidos a partir da utilização da tecnologia Doppler na elucidação de eventos biológicos ovarianos. Tem sido refinado o conhecimento na fisiologia reprodutiva de grandes ruminantes. Todavia, a ciência nos pequenos ruminantes ainda carece de mais informações e com uma janela de conjunturas aos estudiosos da temática.

2.1.2.3 Ultrassonografia na previsão da funcionalidade luteal

O padrão ouro para a avaliação da função luteal é pela análise da concentração de P4 plasmática, onde esta excede 1,0 ng/mL na presença de um CL funcional (MINTON et al., 1991). Entretanto, o diagnóstico baseado na interpretação da P4 possui dois grandes limitantes: o primeiro relacionado ao alto custo e o segundo em torno da logística temporal entre a coleta de sangue e divulgação do resultado. Assim, novas metodologias vêm sendo sugeridas a fim de se obterem correlações e pontos de corte entre os achados ultrassonográficos com a P4. A ultrassonografia modo-B permite a avaliação da área, volume e diâmetro do CL e vem sendo proposta por diversos autores com potencial promissor para a verificação da funcionalidade luteal em ruminantes

(SIMÕES et al., 2007; BICALHO et al., 2008; ARASHIRO et al., 2010b). Entretanto, não é claro se a mensuração biométrica seria o parâmetro mais adequado para a avaliação do estado funcional luteal, principalmente durante a fase de regressão (luteólise) em que o tamanho da glândula diminui gradativamente quando comparado à queda brusca da P4 (SIMÕES et al., 2007; ARASHIRO et al., 2010). Assim, a tecnologia de US com Doppler colorido surge com a base fisiológica das concentrações de P4 dependerem do fluxo de sangue luteal (KAESSMEYER e PLENDL et al., 2009; HU et al., 2010; NISHIMURA e OKUDA, 2015). Neste contexto, novos estudos têm demonstrado correlações e pontos de corte promissores por meio da análise de fluxo vascular luteal com a P4 em ovinos, bovinos e equinos (GINTHER et al., 2007; HERZOG et al., 2010; HERZOG et al., 2011; FIGUEIRA et al., 2015).

Tem sido postulado que o fluxo vascular luteal, pelo US modo Doppler Colorido, pode ser mensurado subjetivamente por meio dos escore de vascularizações luteal (1-4) ou pela estimativa percentual de perfusão (0-100%) entre a área total do CL e a área repleta de vasos sanguíneos (SIQUEIRA et al., 2013; PUGLIESI et al., 2014; TARSO et al., 2016). Todavia, pela técnica apresentar influência da experiência do operador e baixo grau de repetibilidade entre operadores, tem sido proposta a mensuração objetiva (semi-quantitativa) pela avaliação do número de pixels (HERZOG et al., 2010; HERZOG et al., 2011; TARSO et al., 2016). Para tal técnica, são adotados sistemas de análise de imagem assistida por computador e de acordo com Bollwein et al. (2002), os valores obtidos possuem alta reprodutibilidade intra-observador (icc: 0,90) e, desta forma seria uma alternativa a avaliação subjetiva do fluxo vascular luteal.

2.1.3 Estacionalidade reprodutiva em caprinos

Em um passado remoto, os primeiros seres humanos eram nômades e adaptados à disponibilidade estacional de produtos de origem animal (BALASSE et al., 2003, 2006). Com o processo de domesticação, houve a perda desta estacionalidade sobre diversas matérias primas de procedência animal (ex.: produtos da espécie bovina). Entretanto, os produtos derivados de pequenos ruminantes junto ao seu ciclo reprodutivo permaneceram sazonais, mesmo depois de um prolongado processo de domesticação (ORTAVANT et

al., 1985; CHEMINEAU et al., 2007). No clima temperado, principalmente, a oferta de leite e carne de ovinos e caprinos oscila bastante ao longo do ano. O fato possui consequências preocupantes à atratividade destes diferentes produtos para a indústria beneficiadora e ao preço pago ao produtor rural. Esta realidade enfraquece a cadeia produtiva e torna inconstante a receita obtida a partir da produção destas espécies (CHEMINEAU et al., 2007).

No âmbito reprodutivo, as cabras, de modo geral, apresentam variações estacionais em seu comportamento sexual e na frequência e taxa de ovulação. Neste contexto, tem sido descrita uma combinação complexa de eventos que regem o ritmo circadiano endógeno. Basicamente, é conhecida a influência da luz e melatonina no controle da atividade pulsátil dos neurônios para GnRH na área pré-optica médio basal do hipotálamo. Nos últimos anos, tem sido relatado o papel de outros eventos neuroendócrinos que auxiliam na modulação reprodutiva estacional. Finalmente, também vêm sendo detectada uma variabilidade entre raças e indivíduos no controle e sensibilidade ao fotoperiodismo junto ao seu potencial de transmissão hereditária (CHEMINEAU et al., 2010).

2.1.3.1 Controle neuroendócrino da estacionalidade reprodutiva

As mudanças estacionais na atividade reprodutiva originam-se, quase que exclusivamente, a partir de oscilações na liberação de FSH e LH pela hipófise. Esta, por sua vez, é controlada pela pulsatilidade do GnRH em nível hipotalâmico (BARRELL et al., 1992). O padrão anual de atividade reprodutiva está relacionado com o solstício do inverno e verão que causa variações progressivas na duração da luz/escuridão. É consolidado que dias longos possuem efeito inibitório enquanto que dias curtos estimulam a atividade sexual em cabras estacionais. No entanto, os efeitos do fotoperíodo podem ser manipulados. Jackson, Gibson e Kuehl (1988) ao submeterem ovinos a um período constante de fotoperíodo, modularam a refrateriedade dos animais aos efeitos do fotoperíodo externo de dias curtos ou longos. Assim, este conhecimento tem sido aplicado nas últimas décadas em tratamentos fotoperiódicos em fazendas ou em centros de inseminação artificial visando à otimização dos sistemas produtivos (CHEMINEAU et al., 2007). O estímulo

luminoso é percebido pelos olhos e então é transmitido pela via multi-sináptica para a glândula pineal a qual transduz o sinal fótico em químico, a melatonina. Interessantemente, as concentrações de melatonina no sangue periférico são repetitíveis intra-indivíduo, mas variáveis inter-indivíduos. Curiosamente, esta característica possui herdabilidade forte e está relacionada ao tamanho e peso da pineal e com índices reprodutivos (CHEMINEAU et al., 2002). A melatonina é direcionada aos tecidos cerebrais e periféricos por meio do líquido cefalorraquidiano (MALPAUX et al., 2001; TRICOIRE et al., 2002). Thiery et al. (2009) demonstraram que o volume proteico do líquido cefalorraquidiano (LCR) em ovelhas sofre influência estacional; ele aumenta durante os dias curtos e diminui nos dias longos. Portanto, este fenômeno poderia explicar as diferenças estacionais de hormônios a partir do LCR, e de certa forma, afetar a transmissão da melatonina para outros locais reativos no interior do cérebro.

Em nível hipotalâmico, concentrações rítmicas de melatonina atuam sobre a região pré-mamilar do hipotálamo (PMH) no receptor de melatonina tipo 1 (MT1) e após certo tempo de sensibilização (~45 dias; VIGUIÉ et al., 1995) se engatilham os pulsos de GnRH desencadeando a liberação de FSH-LH hipofisário e a atividade sexual (MALPAUX, 2006). Igualmente, também tem sido descrito o aumento na expressão e ligação do receptor serotoninérgico 2A (5-HT_{2A}) ao PMH com a alta atividade pulsátil do LH durante as fases ativas de estados refratários nas fêmeas (CHEMINEAU et al., 2003). A melatonina também opera na *Pars tuberalis* (hipófise anterior) na produção de prolactina que também rege um ritmo circadiano anual (LINCOLN, 2002). Ainda nesta região, também tem sido descrito o papel da melatonina no estímulo de uma via de sinalização complexa que envolve diferentes *Clock* genes (HAZLERIGG et al., 2004; HANON et al., 2008).

Os hormônios esteroides sexuais também parecem desempenhar papel na estacionalidade reprodutiva. Legan e Karsch (1980) identificaram alterações estacionais de liberação e pulsabilidade de LH em resposta ao E2. Neste estudo, tanto ovelhas ovariectomizadas (com implante exógeno de E2) quanto ovelhas sãs demonstraram o mesmo perfil de LH entre as estações (anestro: baixa pulsabilidade e concentração; período cíclico: alta pulsabilidade e concentração). Nos últimos anos, também tem sido especulado que o transporte de esteroides da periferia para o sistema nervoso central poderia

sofrer influência de acordo com mudanças estacionais na permeabilidade da barreira hematoencefálica (THIERY et al., 2006). Todavia, grande parte deste sistema operacional parece ocorrer dentro de áreas hipotalâmicas específicas e sensíveis ao E2.

O núcleo dopaminérgico A15 na região retroquiasmática hipotalâmica é provavelmente a sede da rede entre as células sensitivas ao E2 e aos neurônios de GnRH da área pré-óptica (THIERY et al., 1995). Dentro do núcleo A15, os neurônios estão em contato por terminais glutamatérgicos. De acordo com Singh et al. (2009), o número de contatos estreitos ficaria significativamente maior no anestro do que durante a época reprodutiva. Ademais, em ovelhas, têm sido demonstradas mudanças estacionais nas moléculas de adesão celular neuronal (NCAM). Estas possuem maior expressão junto a neurônios de GnRH na área pré-óptica durante a estação reprodutiva quando comparado ao anestro (VIGUIÉ et al., 2001; LEHMAN et al., 2002).

Uma série de pesquisas vem demonstrando que a tiroxina (T4) desempenha um papel crucial na estacionalidade reprodutiva em pequenos ruminantes. Nicholls et al. (1988) concluíram que quando ovelhas foram tireoidectomizadas (THX) no anestro, retomaram a atividade sexual como esperado na estação seguinte, porém não houve a transição para o anestro e os animais permaneceram sexualmente ativos. Além disso, demonstrou-se que o perfil de melatonina ainda acompanhava o fotoperíodo. Em adição, tem sido relatado que em animais THX, os mecanismos de retroalimentação da P4 e E2 foram preservados (WEBSTER et al., 1991b). Igualmente, a amplitude e frequência dos pulsos de GnRH e LH e o número e morfologia global de neurônios de GnRH (WEBSTER et al., 1991a). Na sequência, Viguié et al. (1999), relataram que uma pequena dose de T4, injetada intracerebroventricular, foi o suficiente para estabelecer a condição de anestro. Já quando a aplicação foi feita periféricamente, não se obteve efeito. Portanto, foi concluído que o local de ação da T4 é central. Na tentativa de encontrar o sítio de atuação da T4 no sistema nervoso central, Anderson et al. (2003) colocaram implantes de T4 em vários locais dentro do hipotálamo e apenas os implantes localizados na área pré-óptica ventromedial (POA) ou no hipotálamo mediobasal (MBH) foram eficientes. Este estudo demonstrou que a T4

desempenha um papel permissivo dentro do POA ou MBH durante um período de tempo, que se estende desde o fim da estação reprodutiva até o final do anestro. Neste contexto, foi sugerido um modelo em que a melatonina (em dias longos) desencadearia um aumento de T4 no interior do MBH, que por sua vez provocaria a entrada e a manutenção do anestro. Por fim, dados recentes vêm implicando o núcleo dopaminérgico A15 e a expressão de sinapsinas deste local, dependentes de tiroxina, na transição fisiológica ao anestro tornando-o um candidato atraente para novas pesquisas envolvendo o papel da T4 na reprodução (ADAMS et al., 2006; LEHMAN et al., 2010).

Estudos recentes têm relacionado o papel estimulatório do peptídeo Kiss e neurônios Kiss 1, presentes na POA e núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), na pulsatilidade de GnRH/LH (CLARKE et al., 2009; SMITH, SALEH e CLARKE, 2009; CHALIVOIX et al., 2010). Em caprinos, os neurônios Kiss já foram identificados no ARC durante a fase folicular, a fase lútea e o anestro estacional (JAFARZADEH SHIRAZI et al., 2014). Tem sido demonstrado que a expressão do peptídeo Kiss é marcadamente regulada no ARC no início da estação de reprodução (SMITH et al., 2009), assim como possuiria uma papel permissivo de resposta ao efeito macho em ovelhas no anestro (DE BOND et al., 2013). Além disso, o número dos neurônios Kiss 1 em pequenos ruminantes seria maior na época de reprodução do que na época de não-reprodução (CHEMINEAU et al., 1992b; ESTRADA et al., 2006). Smith, Saleh e Clarke (2009) demonstraram que o tratamento com peptídeo Kiss (20µg; endovenoso) estimulou a liberação de LH durante o anestro estacional em ovelhas. Já Arjmand et al. (2014) não conseguiram mimetizar este mesmo efeito em caprinos no Irã. Interessantemente, também já foi demonstrado que um simples polimorfismo de nucleotídeos no gene Kiss 1 estaria associado com o aumento da prolificidade em caprinos (AN et al., 2013).

Tem sido proposto que animais estacionais possuem um relógio circadiano anual, similar ao ritmo circadiano diário. Gomez-Brunet et al. (2008) ao estudarem o comportamento estacional de ovinos domésticos e selvagens mantidos sobre fotoperíodo artificial (dias longos) ou natural por 18 meses, observaram oscilações na concentração de melatonina em resposta a luminosidade imposta. Entretanto, o pico fisiológico de melatonina e o ritmo circanual de prolactina não diferiram em resposta ao fotoperíodo imposto.

Outrosim, os ovinos selvagens sofreram menor influência sobre a atividade ovulatória anual quando comparado os ovinos domésticos no desafio ao fotoperíodo artificial de dias longos. Deste modo, o fotoperíodo pode contribuir na regulação do ritmo circadiano anual, mas não atua isoladamente.

Por fim, observa-se que a frequência de liberação do GnRH no sistema porta-hipofisário é controlada por diversos mecanismos neuroendócrinos. Estes podem ser sumarizados por quatro grupos principais intimamente conectados (Figura 3).

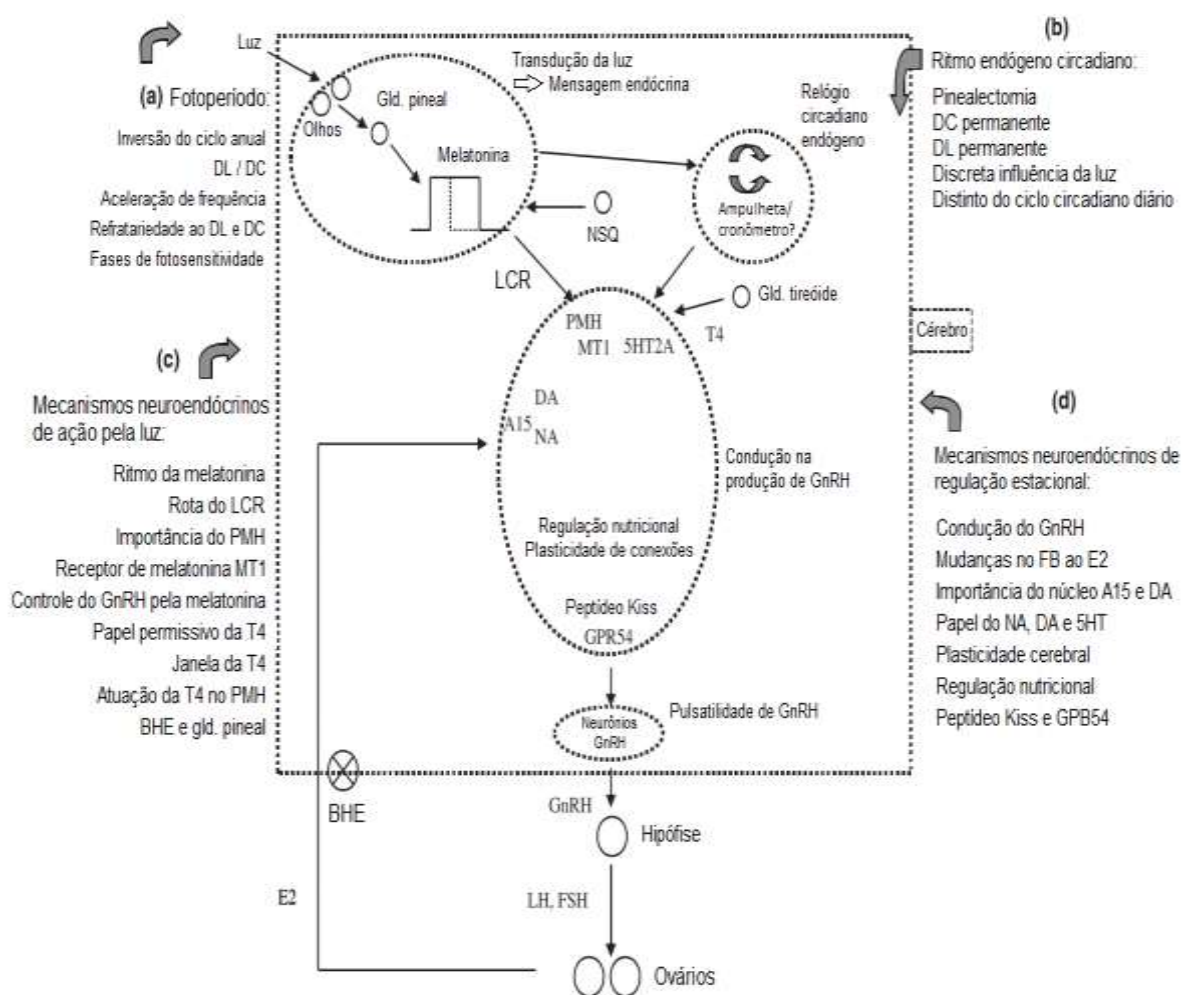


Figura 3. Representação esquemática do controle neuroendócrino da atividade reprodutiva estacional em ovinos e caprinos. Os vários mecanismos foram colocados em quatro grupos que interagem entre si. Grupos (a) e (b) DC = dias curtos, DL = dias longos; Grupo (c) FB ao E2 = retroalimentação de estradiol, DA = dopamina, NA = Noradrenalina, 5HT = serotonina; Grupo (d) LCR = líquido, PMH = hipotálamo pré-mamilar, MT1 = receptor para Melatonina 1, T4 =

Tiroxina, 5HT = serotonina, 5HT2A = receptor de serotonina 2A, BHE = barreira hematoencefálica, GPR54 = receptor de peptídeo Kiss. Outras: NSI = núcleo supraquiasmático, A15 = núcleo retroquiasmático do hipotálamo A15, E2 = estradiol, LH = hormônio luteinizante, FSH = hormônio folículo estimulante. Adaptado de Chemineau et al. (2010).

2.1.3.2 Estacionalidade reprodutiva nos trópicos e fatores que a influenciam

Chemineau et al. (1992a) e Galina et al. (1995) ao manejarem cabras leiteiras europeias (Saanen, Alpina e Toggenburg) sobre condições tropicais, demonstraram que as mesmas continuam a expressar estacionalidade reprodutiva. Entretanto, foi demonstrado que cabras Alpina submetidas ao fotoperíodo tropical (11-13 horas de luz por dia) por três anos seguidos, começaram a antecipar e aumentar o período da estação reprodutiva, a partir do segundo ano de estudo (CHEMINEAU et al., 1992a). Já Silva et al. (1998) relataram que embora cerca de 85% das cabras Alpinas tivessem concentrado a estação reprodutiva numa determinada época do ano (20 °N), algumas fêmeas manifestavam atividade sexual fora da estação quando manejadas junto ao macho, demonstrando assim a importância do efeito macho no manejo destes animais. Lozano et al. (2011) declararam que independente da origem geográfica, cabras Nubianas, Alpinas e mestiças Nubianas x Crioulas (raça local) apresentavam estacionalidade com o mesmo perfil de entrada e saída da estação reprodutiva mesmo sob condições tropicais (22°N). Neste estudo, apenas as cabras mestiças expressaram um padrão de atividade ovulatória mais disperso, quando comparado aos outros dois grupos. Em latitudes ao sul, Nogueira et al. (2015) ao trabalharem com caprinos Boer na Austrália (19 °S), identificaram o período de anestro em 90% dos caprinos entre os meses de Setembro e Dezembro. Além disso, o retorno do anestro foi gradual de Dezembro a Março em que 100% dos caprinos voltaram a ovular. Por fim, Delgadillo et al. (2011), apresentaram resultados interessantes ao constatar que em cabras nativas de condições subtropicais (26 °N), a refratariedade a dias longos e curtos que seria o fator regulador na transição entre a entrada e saída da estação reprodutiva e não a sensibilidade ao aumento ou diminuição do estímulo luminoso local. Em adição, os autores ratificaram a importância do

ritmo endógeno na regulação da atividade reprodutiva em caprinos subtropicais. Deste modo, a estacionalidade reprodutiva em caprinos possui um ritmo endógeno biológico refinado por oscilações do fotoperíodo.

A nutrição junto ao desempenho ponderal, escore de condição corporal - ECC e peso vivo, também podem influenciar na atividade reprodutiva de diferentes raças caprinas. Zarazaga et al. (2005) relataram que a estacionalidade reprodutiva pode ser modificada por alterações nutricionais no manejo e/ou ambiente, levando ao prolongamento da estação reprodutiva em cabras melhor nutridas devido ao maior peso vivo e ECC. Igualmente, Estrada-Cortés et al. (2009) concluíram que o comprimento do período anovulatório poderia ser parcialmente modulado pelo *status* energético nutricional em cabras crioulas mexicanas mantidas em condições tropicais. Neste contexto, De Santiago-Miramontes et al. (2009) descreveram que cabras com baixa condição corporal tiveram uma estação reprodutiva encurtada junto a ciclos estrais anormais e menores ovulações comparado a cabras com melhor condição corporal. Recentemente, Gallego-Calvo et al. (2014) demonstraram que o peso corporal e o ECC possuem influência sobre a entrada, saída e duração da estação reprodutiva em cabras espanholas (37 °N). Neste estudo, foi verificado o prolongamento da estação reprodutiva em cabras com ECC $\geq 2,75$ e peso corporal ≥ 40 kg. Além disso, algumas cabras com ECC $\geq 2,75$ apresentaram ovulações durante o anestro estacional, enquanto que nenhuma cabra com ECC $\leq 2,5$ ovulou neste mesmo período. Por fim, Morales et al. (2016) demonstraram que a estacionalidade reprodutiva de cabras Crioulas Mexicanas (22 °N) poderia ser influenciada não apenas pelo fotoperíodo ou peso corporal como também por fatores ambientais. Os autores observaram que a concentração de P4 foi positivamente associada com a umidade absoluta, a pressão atmosférica, o peso vivo e índice de massa corporal dos animais. Igualmente, foi negativamente influenciada pelo comprimento da luz do dia, precipitação e temperaturas acima de 26 °C.

No contexto da interrelação nutrição e reprodução surgem os índices bioquímicos metabólicos. Segundo Gonzalez (2000), a composição bioquímica do sangue reflete de maneira confiável o equilíbrio entre o ingresso, o egresso e a metabolização dos nutrientes nos tecidos animais. Sendo assim, o perfil metabólico em ruminantes pode ser usado para monitorar a adaptação

metabólica, diagnosticar desequilíbrios no balanço de energia-proteína, pesquisar problemas reprodutivos no plantel e revelar as causas que estão por trás da manifestação de uma doença nutricional ou metabólica (CASTILLO et al., 2016). No estudo dos parâmetros bioquímicos do sangue, glicose, colesterol, triglicérides e ureia representam o metabolismo energético; ureia, proteínas totais, e albumina representam o metabolismo protéico; cálcio, fósforo inorgânico, magnésio, ferro, sódio e potássio representam os minerais (GONZALEZ E SILVA, 2003). Na última década, diversos estudos vêm utilizando o perfil metabólico para justificar os achados reprodutivos em pequenos ruminantes, tais quais: o efeito do *flushing* na taxa de ovulação (SCARAMUZZI et al., 2006; SOMCHIT et al., 2007); influência da ordem de parição sobre a lactação (MUNDIM et al., 2007); e estacionalidade ou desempenho reprodutivo (BALARO et al., 2014). Desse modo, é de suma importância o uso do perfil metabólico dentro de estudos voltados para a reprodução animal, para a elucidação das respostas biológicas, em virtude do seu amplo papel interpretativo.

No Brasil, os primeiros estudos no âmbito da estacionalidade em caprinos datam dos anos 80. Simplício et al. (1986) demonstraram que raças nativas nordestinas não possuíam variação na atividade sexual no decorrer do ano. Já Lopes Junior et al. (2001) demonstraram, ineditamente, que cabras adultas jovens da raça Saanen, sob regime intensivo, não apresentaram estacionalidade para o comportamento de estro no Ceará (3 °S). Ademais, o período de chuvas pareceu ser um fator ambiental que influenciou na qualidade da atividade sexual e desempenho nestas cabras. Na sequência, Cruz et al. (2003) relataram que ao descer de latitude, na região da Bahia (14 °S), cabras Saanen apresentavam inatividade sexual no verão. Adicionalmente, ao utilizarem a US para estudo da dinâmica folicular em cabras Saanen e Anglo-Nubiana durante o período de anestro, Cruz, Rondina e Freitas (2005) comprovaram que o padrão de crescimento folicular em ondas, intervalados entre 4-6 dias, era mantido. Além disso, demonstrou-se que os folículos antrais cresciam a tamanhos equivalentes a estádios pré-ovulatórios neste período.

Na região Sudeste, estudos acerca da atividade reprodutiva em caprinos leiteiros têm sido pontuais, realizados na estação ou contraestação, e não realizam um acompanhamento prospectivo do plantel (MAFFILI et al., 2006;

SOUZA et al., 2011). Genericamente, nestas raças, é descrito o comportamento sexual do verão ao inverno no Estado de Minas Gerais (MOUCHEREK e MOULIN, 1987), com maior incidência no mês de abril, variando de fevereiro a julho (NUNES, 1985) em Alagoas. Todavia, não existem relatos científicos a respeito do comportamento reprodutivo anual em rebanhos leiteiros na região Sudeste que apresenta baixas variações no fotoperíodo.

Em conclusão, quando a luminosidade apresenta baixa variação, como ocorre em latitudes tropicais e subtropicais, outros eventos ambientais podem ser adotados como complemento para depurar o ritmo reprodutivo (CHEMINEAU et al., 2004). A nutrição (DUARTE et al., 2008; ESTRADA-CORTÉS et al., 2009; DE SANTIAGO-MIRAMONTES et al., 2009; GALLEGOCALVO et al., 2014), fatores sócio sexuais como o efeito macho e fêmea (SCARAMUZZI e MARTIN et al., 2008; ABECIA et al., 2015; DELGADILLO et al., 2015; PONCE et al., 2015; ORIHUELA et al., 2016) e os aspectos climáticos como chuvas (SILVA et al., 1998; MORALES et al., 2016) parecem ser componentes importantes na plasticidade cerebral. O efeito associativo desses fatores poderiam explicar a grande variabilidade observada nos estudos internacionais ao tentar caracterizar o padrão estacional da atividade reprodutiva em cabras sob condições tropicais e subtropicais.

2.1.4 Fatores que influenciam em programas de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET) em caprinos

Protocolos superovulatórios, tradicionais, são adotados rotineiramente ao redor do mundo. Os seus resultados vêm sendo publicados desde a década de 80 (COGNÍÉ, 1999). Resumidamente, são utilizados dispositivos intravaginais contendo progestágenos, por 11-14 dias, associado a seis a oito doses decrescentes de FSH, duas vezes por dia, antes da retirada do dispositivo. Geralmente, uma dose luteolítica de PGF_{2α} ou análogo sintético é ministrada no início ou término do tratamento, assim como uma dose de eCG (200-400 UI) ao final do tratamento. Não obstante, Menchaca et al. (2009), a partir de resultados da superovulação de 708 ovelhas Merino, sugeriram a diminuição do período de exposição ao progestágeno para 5-7 dias e

questionaram o uso da eCG, pois a sua ausência não afetou o número de CL obtidos e embriões viáveis. Igualmente, também se indicou o uso de análogos do GnRH visando o sincronismo da ovulação para incremento na fertilização, conforme salientado por Rubianes e Menchaca (2003). Deste modo, o início do século XXI tem sido marcado por estudos centralizados na adequação ou reorganização hormonal dos protocolos tradicionais (COGNIE et al., 2003; MENCHACA et al., 2010).

Paralelamente, conforme ressaltado por González-Bulnes et al. (2004) e Ammoun et al. (2006) o sucesso de um programa de MOET também é determinado por diversos fatores intrínsecos (raça, idade, nutrição, estado reprodutivo e estresse) e extrínsecos (fonte e pureza dos hormônios, protocolo hormonal). Entretanto, Baldassarre (2008) ratifica que mesmo que grande parte das fontes de variação tenha sido minimizada ou eliminada, a resposta da doadora aos protocolos superovulatórios pelas gonadotrofinas continua sendo um desafio, principalmente devido à variabilidade da resposta folicular e o chamado efeito “intrínseco ou individual” da doadora. Assim, a implementação de programas de transferência de embriões, sob condições de campo, tem sido limitada, pois mesmo sob igual tratamento superovulatório a indivíduos da mesma raça e rebanho, é constatada uma alta variabilidade nos resultados obtidos (AMIRIDIS et al., 2012).

2.1.4.1 O estado ovariano

Diversos protocolos superovulatórios tradicionais vêm utilizando o FSH sem considerar o momento da dinâmica folicular nas doadoras. Estudos propostos por Veiga-Lopez et al. (2006) indicaram que a presença de folículos dominantes no início do tratamento superovulatório pode comprometer a competência de folículos maiores de 2 mm repercutindo ao aumento de folículos anovulatórios. Estes, por sua vez, promoveriam uma diminuição no número total de embriões recuperados e viáveis em cabras (MENCHACA et al., 2002; GONZALEZ-BULNES et al., 2004; MENCHACA et al., 2007) e ovelhas (GONZALEZ-BULNES et al., 2003; VEIGA-LOPEZ et al., 2005; MENCHACA et al., 2009). Justifica-se que folículos grandes ou anovulatórios, produtores de E2, promoveriam efeitos deletérios nos oócitos ovulados e/ou modificações no

ambiente uterino que comprometeriam a migração e desenvolvimento embrionário. Considerando que folículos dominantes podem estar presentes em cerca de 70-85% das fêmeas no início do estímulo superovulatório (VEIGA-LOPEZ et al., 2005; MENCHACA et al., 2007), corrobora-se com os índices inconsistentes descritos na MOET.

A imprevisibilidade do dia de emergência de cada onda folicular em pequenos ruminantes, principalmente nos protocolos tradicionais, surge como questão. Além disso, é vantajosa a sincronização e superovulação das fêmeas na ausência de folículos dominantes. Neste conceito, foi proposto um novo protocolo, conhecido como “Dia 0”, visando sincronizar a ovulação e superovulação no primeiro dia do ciclo estral (Figura 4). Em caprinos, sua adoção resultou no melhor recrutamento folicular e maior número de ovulações quando comparado ao protocolo convencional (MENCHACA et al., 2002; 2007). Além disso, tem sido relatada uma menor incidência de anormalidades pós-ovulatórias junto ao aumento da taxa de ovulação, fertilização e número de corpos lúteos (MECHACA et al., 2007, MARTEMUCCI et al., 2008, MAYORGA et al., 2008, MENCHACA et al., 2009).

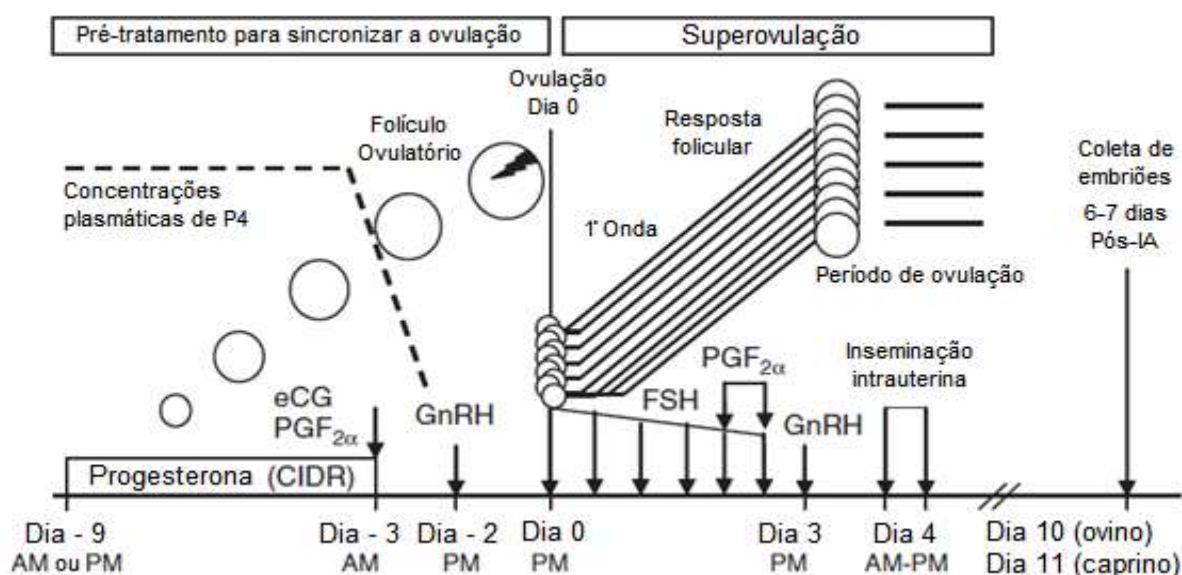


Figura 4. Representação esquemática do protocolo superovulatório “Dia 0” no início da primeira onda folicular em pequenos ruminantes (adaptado de RUBIANES E MENCHACA, 2003; retirado de MENCHACA et al., 2010). Previamente, é feito um tratamento para a indução do estro e ovulação

sincronizada. A administração de FSH começa 72-84 h após a retirada do implante.

Recentemente, variações do protocolo “Dia 0” vêm sendo propostas na literatura. De acordo com Ayres et al. (2012), bons índices ovulatórios também foram obtidos (~14 CL) ao se iniciar o protocolo hormonal entre o sexto e nono dia do ciclo estral. Como argumento, é alegado o melhor período fisiológico ovariano, no início da segunda onda folicular, sob concentrações altas de P4 (> 5 ng/mL) e baixas de E2 (DE CASTRO et al., 1999). Nesta fase, o CL é responsivo a aplicação de PGF_{2α} exógena culminando com a queda da P4 plasmática e permissão do crescimento e maturação dos folículos recrutados. Além disso, durante a primeira onda folicular, os folículos dominantes atingem maior diâmetro e duram mais tempo do que os folículos dominantes originados durante a segunda e terceira onda (DE CASTRO et al., 1999; LEBOEUF et al., 2003; SIMÕES et al., 2006), devido as baixas concentrações de P4 circulante durante a primeira onda folicular e concentrações elevadas nas ondas subsequentes. Assim, a P4 mais alta, nesta fase, resulta na perda de posição dominante e atresia de folículos persistentes (DE CASTRO et al., 1999; MENCHACA E RUBIANES, 2002; KOJIMA et al., 2003). Destarte, independente da adoção de protocolos com base na primeira ou segunda onda folicular, é imprescindível a erudição do estado ovariano na previsão das respostas superovulatórias e busca de melhores índices na MOET.

2.1.4.2 O efeito “intrínseco” ou “individual” na modulação do potencial da doadora de embriões

O chamado efeito “intrínseco ou individual” da doadora advém da alta variabilidade de resposta inter-indivíduos e até mesmo na repetitividade intra-indivíduo em protocolos superovulatórios (BARI et al., 2001; PTAK et al., 2003; BRUNO-GALARRAGA et al., 2014). Nos tempos atuais, tem sido proposto o papel das mutações genéticas e da reserva ovariana na elucidação da temática. Estudos na tentativa de elucidar este efeito em caprinos ainda são incipientes. Porém, já existem teorias e literaturas consolidadas na espécie

ovina (FABRE et al., 2003; FEARY et al., 2007; TORRES-ROVIRA et al., 2016).

Têm sido postulado que mutações em um grupo de genes, estreitamente ligados, aumentariam significativamente a taxa de ovulação em ovinos (DAVIS, 2005). Esses genes fazem parte da superfamília do TGF- β , oriundos do ovário, e são conhecidos por poderem afetar o receptor da proteína morfogenética óssea – 1B (BMPR-1B; mutação FecB), a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15; mutação FecX) ou o GDF-9 (mutação FecG).

Os primeiros estudos se iniciaram na década de 80 a partir da identificação do gene Booroola (FecB) em ovelhas Merino na Austrália (TURNER, 1982). Foi proposto que a mutação no BMPR-1B presente no cromossomo 6 estaria relacionada a maior taxa de ovulação e prolificidade (FOGARTY, 2009). O BMPR-1B é expresso por oócitos e células da granulosa na fase de desenvolvimento folicular inicial até a fase antral final. A mutação FecB gera substituição no BMPR-1B^{Q249R} culminando com a perda parcial do receptor que o torna menos sensível às proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), principalmente ao GDF5 e BMP4 (FABRE et al., 2003; FEARY et al., 2007). Esta ação inibe parcialmente a secreção de P4 a partir de células da granulosa e culmina com o aumento da concentração de FSH. Adicionalmente, as células da granulosa também possuem maior responsividade ao FSH e desenvolvem precocemente receptores para LH (MONTGOMERY et al., 2001). Por fim, o nível mais baixo das BMP15 derivadas do oócito combinado com a capacidade precoce de resposta das células da granulosa ao LH justificam as maiores taxas de ovulação (MULSANT et al., 2001; PRAMOD et al., 2013).

No intuito de diferenciar populações genéticas, foi demonstrada a potencialidade da gonadotrofina coriônica equina (eCG), dose única, como um instrumento eficaz em segregar populações de ovelhas adultas (KELLY et al., 1983; LAHOZ et al., 2011) e borregas pré-púberes em prolíficas ou não (DAVIS et al., 1985; GOOTWINE et al., 1989; GOOTWINE et al., 1993). Entretanto, este tratamento não permitiu a diferenciação individual dos portadores do gene FecB (KELLY et al., 1983; DAVIS et al., 1985; GOOTWINE et al., 1993) devido a grande variabilidade na taxa de ovulação observada em ovelhas deste genótipo (KELLY et al., 1983). Outro estudo recente, demonstrou uma correlação significativa ($r^2=0,63$) entre a utilização de um tratamento

superovulatório de triagem com eCG seguido do tratamento subsequente com FSH em ovinos (BRUNO-GALARRAGA et al., 2015). Portanto, a utilização de um protocolo de triagem com eCG, módico quando comparado ao FSH, pode ser vantajoso na identificação das melhores doadoras de embrião e auxilia na proscrição do chamado "efeito individual".

O conceito de reserva ovariana e sua relação benéfica com a fertilidade iniciaram a partir de estudos na medicina humana. Nos últimos anos, surgiram dois métodos rotineiros na avaliação da reserva ovariana. São esses: (1) a contagem de folículos antrais (CFA) - biomarcador ultrassonográfico do número de folículos; e (2) a concentração plasmática do hormônio anti-mulleriano (AMH) - biomarcador hormonal do número de folículos (FLEMING et al., 2015). O AMH é uma glicoproteína pertencente à superfamília TGF- β . É expresso apenas nas gônadas e desempenha um papel importante na diferenciação sexual e funcionamento ovariano e testicular dos mamíferos. No ovário, o AMH é produzido pelas células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais pequenos em crescimento. Ele inibe o recrutamento de folículos primordiais evitando-se o esgotamento prematuro da reserva folicular ovariana (DURLINGER et al., 1999; 2002a; GIGLI et al., 2005; ROCHA et al., 2016). Nas fases gonadotrofina responsiva e dependente, o AMH atua como um modulador parácrino e autócrino de diferenciação celular. Particularmente, diminui a capacidade de resposta das células da granulosa e da teca ao FSH e LH, respectivamente (DI CLEMENTE et al., 1994; DURLINGER et al., 2001; CAMPBELL et al., 2012; VISSER e THEMME, 2014). Em suma, o AMH possui uma importante função na manutenção da quantidade e longevidade do pool de folículos primordiais devido a sua ação inibitória sobre os folículos pré-antrais (ROCHA et al., 2016).

O AMH também parece influenciar distintamente de acordo com a taxa de ovulação fisiológica das espécies domésticas. Em espécies com ovulações múltiplas (ex.: roedores), ao bloquear a expressão de AMH ou o receptor tipo II de AMH (AMHRII), tem-se observado o aumento na taxa de recrutamento de folículos primordiais e no número de folículos pré-antrais e antrais pequenos, todavia, sem incrementar a taxa de ovulação (DURLINGER et al., 2002b). Já em espécies de ovulações únicas (ex. ruminantes), o bloqueio do AMH não mostrou nenhum efeito significativo na população de folículos primordiais.

Entretanto, levou ao decréscimo na população de folículos antrais e pré-antrais pequenos (gonadotrofina responsivos), e ainda ao acréscimo do número de folículos antrais grandes (gonadotrofina dependentes) junto a aproximadamente uma duplicação da taxa de ovulação (CAMPBELL et al., 2012).

A concentração plasmática de AMH pode ser um marcador viável na determinação da reserva ovariana e fertilidade de borregas pré-púberes. Lahoz et al. (2011) demonstraram que um teste de triagem com eCG (600 UI) seguido da contagem das ovulações poderia diferenciar borregas com alta (até três a quatro vezes maior) ou baixa concentração plasmática de AMH, coletada previamente ao estímulo hormonal. Na sequência, os autores relacionaram os resultados hormonais com as taxas de concepção obtidas na primeira cobertura destes animais. Por fim, indicaram um valor ideal de corte (97 pg/mL; sensibilidade = 68,2%; especificidade = 72,2%) para prever a fertilidade da borrega na primeira cobertura. Outrossim, Torres-Rovira et al. (2014) também atingiram boa resposta para o teste de reserva ovariana a partir da aplicação de FSH exógeno em borregas pré-púberes. Foi alcançada uma correlação positiva entre a contagem de folículos antrais, níveis plasmáticos de AMH, número de folículos grandes (≥ 3 mm) e total de folículos após o estímulo hormonal. Em sequência, Torres-Rovira et al. (2016), demonstraram que cordeiras com alta contagem de folículos antrais (CFA) aos 50 dias de vida possuíam maior concentração de AMH e, por fim, atingiram maiores taxas de concepção na primeira estação reprodutiva. Já em caprinos, Monniaux et al. (2011) demonstraram o potencial do AMH na precisão de diferenciar, boas ou ruins, doadoras de embriões de alta qualidade. Em adição, indicou-se que o teste hormonal poderia ser realizado a partir de uma aferição única sem influência estacional ($296,4 \pm 37,3$ vs. $289,9 \pm 40,7$ pg/ml; primavera vs. outono).

A reflexão gerada pela revisão prévia norteia a respeito dos possíveis mecanismos biológicos envolvidos no chamado “potencial intrínseco” da doadora. Fica claro o papel das mutações genéticas e da administração da reserva folicular pelo AMH, em nível ovariano, como os possíveis responsáveis pelas oscilações na taxa de ovulação entre indivíduos. Embora a via de atuação de cada um pareça ser distinta, um recente estudo em ovinos revelou

a conexão entre ambos. Estienne et al. (2015) demonstraram que a expressão de RNA_m para o AMH e secreção do mesmo pelas células da granulosa eram incrivelmente baixos em ovelhas carreadoras do gene FecB. Nas ovelhas FecB com mutação do receptor BMPR1B (tornando-o pouco funcional), teriam baixos níveis de AMH e assim permitiriam uma maior ativação do crescimento folicular oriundo da reserva ovariana. Em adição, promoveria o desenvolvimento de células foliculares sob maior sensibilidade ao FSH e LH, conforme já descrito por Campbell et al. (2012) e Visser e Themmer (2014). Por esse mecanismo, o baixo AMH poderia limitar a taxa de perda folicular por atresia, levando ao maior número de folículos em crescimento. Além de induzir precocemente a diferenciação das células da granulosa e a formação de folículos pré-ovulatórios maduros, de menor tamanho, aptos a ovular. Assim, conclui-se que o baixo AMH, em ovelhas FecB, poderia ser a chave determinante na promoção extra do crescimento folicular e taxa de ovulação.

A partir da explanação acima, chega-se ao epílogo na discussão da temática. Se os trajetos na elucidação do potencial intrínseco da doadora margeiam as mutações genéticas e marcadores hormonais, e inevitavelmente um ofusca o outro, a pergunta se consolida em qual diretriz encalçar. Pode-se afirmar que não existem preceitos e sim ponderação. Na presença de rebanhos/animais com baixa prolificidade inata, espera-se a ausência de mutações. Isto posto, indica-se utilizar o AMH plasmático como biomarcador no discernimento de fêmeas com maior reserva folicular e, conseqüentemente, potenciais boas doadoras na produção *in vivo* e *in vitro* de embriões. Já na existência de rebanhos com alta prolificidade inata quando comparado a outros plantéis de mesma raça e manejo, suspeita-se da presença de mutações e deve-se checar pelas mesmas (FecB, FecX ou FecG). De modo geral, as fêmeas mais prolíficas no rebanho, também serão as melhores doadoras. Neste caso, desconsidera-se a seleção de animais pelo AMH, pois este não será uma ferramenta de apuração e sim de descarte de animais carreadores de mutações.

As evidências propostas sugerem a possibilidade de se aplicar distintas ferramentas preditivas para a pré-seleção de doadoras com alta resposta ovulatória. Sendo este, um importante passo do ponto de vista ético, técnico e econômico em programas de MOET. Muitos estudos avançaram no

conhecimento existente na espécie ovina. No entanto, são incipientes os estudos sistemáticos que determinam a aplicabilidade e valor preditivo de tais estratégias em caprinos.

2.1.5 Referências bibliográficas

ABECIA, J.A. et al. Continuous exposure to sexually active rams extends estrous activity in ewes in spring. *Theriogenology*, v.84 p.1549–1555, 2015.

ACOSTA T.J. et al. Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. *Journal of reproduction and Development*, v. 5, p. 273-280, 2005.

ACOSTA T.J. et al. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*, v. 125, p. 759-767, 2003.

ACOSTA T.J. et al. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandina F2 α injection in the cow. *Biology of reproduction*, v. 66, p. 651-658, 2002.

ADAMS, V.L. et al. Morphological plasticity in the neural circuitry responsible for seasonal breeding in the ewe. *Endocrinology*, v.147, p.4843–4851, 2006.

AL-AZRAQI, A.A. Effect of fasting on luteal function, leptin and steroids concentration during oestrous cycle of the goat in natural photo-status. *Animal Reproduction Science*, v. 98, n. 3-4, p. 343-349, 2007.

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.

AMMOUN, I. et al. Effects of breed on kinetics of ovine FSH and ovarian response in superovulated sheep. *Theriogenology*, v. 66, p. 896–905, 2006.

AN, X. et al. Association analysis between variants in Kiss1 gene and litter size in goats. *BMC Genet.* v.14, p.63-68, 2013.

ANDERSON, G.M. et al. The reproductive response of rams to thyroidectomy: mediation by impaired inhibin feedback rather than a change in LH pulsatility. *Reproduction*, v.126, n.3, p. 353-36, 2003.

ARASHIRO, E.K.N. et al. Assessment of luteal function in goats by ultrasonographic image attribute analysis. *Small Ruminant Research*, v. 94, p. 176–179, 2010a.

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, 2010b.

ARJMAND, M. et al. Luteal activity of Abadeh ecotype does in summer and winter and the effect of kisspeptin-10 on luteinizing hormone secretion in the anestrus does. *Veterinary Research Forum* v.5(4), p.247-254, 2014.

AYRES, S.L. et al. Superovulation in goats during the second follicular wave, with or without exogenous progesterone. *Small Ruminant Research*, v. 104, n. 1-3, 146–150, 2012.

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

BALARO, M.F.A. et al. Reproductive performance, metabolic and hormonal profiles of Santa Inês ewes in winter and summer under tropical conditions. *Tropical Animal Health and Production*, v.47(3), p.627-31, 2015.

BALDASSARRE, H. Coleta, conservação e transferência de embrião. In: AISEN, E. *Reprodução ovina e caprina*. São Paulo: Medvet, 2008. 203p.

BARI, F. et al. The repeability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*, v. 56, p. 147-55, 2001.

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

BARTLEWSKI, P.M.; BABY, E.T.; GIFFIN J.L. Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science*, v. 124, p. 259–268, 2011.

BAUER, M.; SCHILLING. N.; SPANEL-BOROWSKI, K. Development and regression of non-capillary vessels in the bovine corpus luteum. *Cell and Tissue Research*, v. 311, p.199–205, 2003.

BEINDORFF, N. et al. Effects of human chorionic gonadotropin on luteal blood flow and progesterone secretion in cows and in vitro – microdialyzed corpora lutea. *Theriogenology*, v. 72, p. 528-534, 2009.

BEINDORFF, N. et al. Vascular changes in the corpus luteum during early pregnancy in the cow. *Journal of Reproduction and Development*, v. 56, n. 2, p. 263-270, 2010.

BERISHA, B.; MEYER, H.; SCHAMS, D. Effect of prostaglandin F2alpha administration on the luteotropic and angiogenic factors during functional luteolysis in the bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, v. 82, p. 940-947, 2010.

BERISHA, B. et al. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 1106–1014, 2000.

BICALHO, R.C.; GALVÃO, K.N.; GUARD, C.L.; SANTOS, J.E. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. *Theriogenology*, v. 70, p. 199–207, 2008.

BOLLWEIN, H. et al. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, v.57, p.2043–2051, 2002.

BOLLWEIN, H. et al. Effects of a shortened preovulatory follicular phase on genital blood flow and endometrial hormone receptor concentrations in Holstein-Friesian cows. *Theriogenology*, v. 73, p. 242–249, 2010.

BOTT, R.C. et al. Uterine vein infusion of interferon tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. *Biology of Reproduction*, v. 82, p. 725-735, 2010.

BOURNE, T. H. et. al. Ultrasound studies of vascular and morphological changes in the human corpus luteum during the menstrual cycle. *Fertility and sterility*, v. 65, p. 753–758, 1996.

BRUNO-GALARRAGA, M. et al. Preselection of high and low ovulatory responders in sheep multiple ovulation and embryo transfer programs. *Theriogenology*, v.84, n.5, p. 784–790, 2015.

BRUNO-GALARRAGA, M. et al. Repetibility of superovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep. *Small ruminant research*, v. 120, p. 84-89, 2014.

BUDE, R.O.; RUBIN, J.M.; ADLER, R.S. Power versus conventional color Doppler sonography: comparison in the depiction of normal intrarenal vasculature. *Radiology*, v. 192, p. 777–780, 1994.

CAMPBELL, B.K. et al. The role of anti-Müllerian hormone(AMH)during follicle development in a monovulatory species (sheep). *Endocrinology*, v. 153, p. 4533–4543, 2012.

CASTILLO, C. et al. Usefulness of metabolic profiling in the assessment of the flock's health status and productive performance. *Small Ruminant Research*, v.142, p.28–30, 2016.

CERBITO, W.A. et al. Evidence of ovulation in goats (*Capra hircus*) with short estrous cycle and its occurrence tropics. in the *Theriogenology*, v. 43, p. 803-812, 1995.

CHALIVOIX, S. et. al. Effects of photoperiod on Kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function. *Journal of Neuroendocrinology*, v.22, p.110–118, 2010.

CHEMINEAU, P. et al. *Changes in the 5-HT_{2A} receptor system in the pre-mammillary hypothalamus of the ewe are related to regulation of LH pulsatile secretion by an endogenous circannual rhythm. BMC Neuroscience*, v.4, n.1, 2003.

CHEMINEAU, P. et al. *Neuroendocrine and Genetic Control of Seasonal Reproduction in Sheep and Goats. Reproduction in Domestic Animals*, v.45, p.42-9, 2010.

CHEMINEAU, P. et al. Seasonal ovulatory activity exists in tropical Creole female goats and Black Belly ewes subjected to a temperate photoperiod. *BMC Physiology*, v.4, p.12- 23, 2004.

CHEMINEAU, P. et al. Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Ruminant Research*, n.8, p.299-312, 1992a.

CHEMINEAU, P. et al. Control of sheep and goat reproduction: Use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science*, v.30(1), p.157-184, 1992b.

CHEMINEAU, P. et al. Seasonality of reproduction and production in farm fishes, birds and mammals. *Animal*, v.1, p.419–423, 2007.

CHEMINEAU, P. et al. The sheep as a mammalian model of plasma melatonin variability. *Reproduction Suppl.*, v.59 (Large Mammals as Neuroendocrine Models), p.181–190, 2002.

CLARKE, I.J. et al. Kisspeptin and seasonality in sheep. *Peptides*, v.30, p.154–163, 2009.

COGNIÉ, Y. et al. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.

COGNIÉ, Y. et al. State of art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v. 51, p. 105-116, 1999.

CONNOLLY, D.T. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 47, p. 219–223, 1991.

CRUZ, J.F. et al. Comportamento sexual de cabras da raça Saanen criadas na região Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p.247-249, 2003.

CRUZ, J.F.; RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F. Ovarian Follicular Dynamics during Anoestrus in Anglo-Nubian and Saanen Goats Raised in Tropical Climate. *Tropical Animal Health and Production*, v. 37, p. 395-402, 2005.

CURSIEFEN, C. et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *Journal of Clinical Investigation*. v. 113, p. 1040-1050, 2004.

DAVIS, G.H. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, v. 37, p.11–23, 2005.

DAVIS, G.H. et al. Ovulation response to pregnant mares' serum gonadotrophin in prepubertal ewe lambs of different Booroola genotypes. *Animal reproduction science*, v. 9, p.51–145, 1985.

DE BOND, J.P. et al. Kisspeptin signalling is required for the luteinizing hormone response in anestrus ewes following the introduction of males. *PLoS One*. p.8-11, 2013.

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 SANTIAGO-MIRAMONTES, M.A. et al. Body condition is associated with a shorter breeding season and reduced ovulation rate in subtropical goats. *Animal reproduction science*, v.114, p.175-182, 2009.

DELGADILLO, J.A. et al. Refractoriness to short and long days determines the end and onset of the breeding season in subtropical goats. *Theriogenology*, v.76, p.1146–1151, 2011.

DELGADILLO, J.A. et al. Sexually active males prevent the display of seasonal anestrus in female goats. *Hormones and Behavior*, v.69, p.8–15, 2015.

DI CLEMENTE, N. et al. Inhibitory effect of AMH upon the expression of aromatase and LH receptors by cultured granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine*, v. 2, p. 553–558, 1994.

DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v.55, p.1211–1239, 2001.

DUARTE, G. et al. Reproductive seasonality in female goats adapted to a subtropical environment persists independently of food availability. *Domestic Animal Endocrinology*, v.8, n.35, p.362- 370, 2008.

DURLINGER, A.L. et al. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, v. 143, p. 1076–1084, 2002a.

DURLINGER, A.L. et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, v. 142, p. 4891–4899, 2001.

DURLINGER, A.L. et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, v. 140, p. 5789–5796, 1999.

DURLINGER, A.L. et al. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction*, v. 124, p. 601–609, 2002b.

ESTIENNE, A. et al. Anti-Müllerian Hormone Regulation by the Bone Morphogenetic Proteins in the Sheep Ovary: Deciphering a Direct Regulatory Pathway. *Endocrinology*, v.156, n. 1, p. 301–313, 2015.

EL-SHERRY, T.M.; MATSUI, M.; MIYAKE, Y. Haemodynamic Changes of the Superovulated Follicle as a Cause of Superovulation Variability in Cattle. *Journal of American Science*, v. 6, n. 10, p. 744-751, 2010.

EL-SHERRY, T.M. et al. Effect of dinoprost and cloprostenol on serum nitric oxide and corpus luteum blood flow during luteolysis in ewes. *Theriogenology*, v. 80, n. 5, p. 513-518, 2013.

ESTRADA-CORTES, E. et al. Nutritional status influences reproductive seasonality in Creole goats: 1. Ovarian activity during seasonal reproductive transitions. *Animal Reproduction Science*, v.116, p.282-290, 2009.

ESTRADA, K.M. et al. Elevated Kiss-1 expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/luteinising hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive feedback. *Journal of Neuroendocrinology*, v.18, p.806-9, 2006.

EVANS, A.C.O. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction of Domestic Animals*, v.38, p.240–246, 2003.

FABRE, S. et al. The Booroola mutation in sheep is associated with an alteration of the bone morphogenetic protein receptor-1B functionality. *Journal of endocrinology*, v. 177, p. 435–444, 2003.

FATET, A.; PELLICER-RUBIO, M.T.; LEBOEUF, B. Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science*, v.124, p.211–219, 2011.

FEARY, E.S. et al. Patterns of expression of messenger RNAs encoding GDF9, BMP15, TGFBR1, BMPR1B, and BMPR2 during follicular development and characterization of ovarian follicular populations in ewes carrying the Woodlands FecX2W mutation. *Biology of Reproduction*, v. 77, p. 990–998, 2007.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews*, v. 18, n.1, p.4–25, 1997.

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, n.4, p.643-650, 2015.

FIELDS, M.J.; FIELDS, P.A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology*, v. 45, p.1295-1326, 1996.

FIELDS, P.A. Relaxin and other luteal secretory peptides: cell localization and function in the ovary. In: Familiari, G., Makabe, S., Motta, P.M. (Eds.), *Ultrastructure of the Ovary*. Kluwer Academic Press, Boston, p. 177-198, 1991.

FLEMING, R. et al. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 31, n. 4, 486–496, 2015.

FOGARTY, N. M. A review of the effects of the Booroola gene (FecB) on sheep production. *Small Ruminant Research*, v. 85, p. 75-84, 2009.

GALINA, M.A. et al. Reproductive performance of Mexican dairy goats under various management systems. *Small ruminant research*, v. 18, n. 3, p. 249-253, 1995.

GALLEGO-CALVO, L. et al. Role of body condition score and body weight in the control of seasonal reproduction in Blanca Andaluza goats. *Animal reproduction science*, v.151, p.157-163, 2014.

GARCIA-ISPIERTO, I.; LOPEZ-GATIUS, F. Effects of human chorionic gonadotropin on luteal blood flow and progesterone secretion in cows and in vitro-microdialyzed corpora lutea. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 224-229, 2012.

GIFFORD, C.A. et al. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 274-280, 2007.

GIGLI, I. et al. Evidence for a role for anti-Müllerian hormone in the suppression of follicle activation in mouse ovaries and bovine ovarian cortex grafted beneath the chick chorioallantoic membrane. *Molecular reproduction and development*, v. 71, p. 480–488, 2005.

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

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; UTT, M.D.; BEG, M.A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science*, v. 99, p.213–220, 2007.

GINTHER, O.J. *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Book 4, Color-Doppler ultrasonography*. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 2007.

GINTHER, O.J., SILVA, L.A., ARAUJO, R.R., BEG, M.A. Temporal associations among pulses of 13,14-Dihydro-15-keto-PGF₂α, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. *Biology of reproduction*, v. 76, p.506-513, 2007.

GOMEZ-BRUNET, A. et al. Endogenous circannual cycles of ovarian activity and changes in Prolactin and Melatonin secretion in wild and domestic female sheep maintained under a Long- Day photoperiod. *Biology of reproduction*, v.78, p.552–562, 2008.

GONZALEZ, F. H. D. Uso do Perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZALEZ, F. H. D. et al. Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

GONZÁLEZ, F.H.; SILVA, S. C. Introdução à bioquímica clínica veterinária. Porto Alegre: UFRGS, 2003. 198p.

GONZÁLEZ-BULNES, A. et al. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reproduction, Fertility and Development*, v.16, p. 421–435, 2004.

GONZÁLEZ-BULNES, A. et al. Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Reproduction nutrition development*, v. 43, p. 17-28, 2003.

GOOTWINE, E. et al. Plasma FSH levels and ovarian response to PMSG in ewe lambs of related genotypes that differ in their prolificacy. *Animal reproduction science*, v. 19, p. 16–109, 1989.

GOOTWINE, E. et al. Reproductive performance of Assaf and Booroola-Assaf crossbred ewes and its association with plasma FSH levels and induced ovulation rate measured at prepuberty. *Animal reproduction science*, v. 31, p. 81–69, 1993.

GOTO, J. et al. Morphological analyses of interleukin-8 effects on rat ovarian follicles at ovulation and luteinization in vivo. *Cytokines*, v. 20, p. 168-173, 2002.

GURAYA, S.S. *Comparative cellular and molecular Biology of ovary in mammals*: fundamental and applied aspects. s.l.: Oxford and IBH Publishing Co., Pvt. Ltd., 2000. p.195-236.

HANON, E.A. et al. Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Current Biology*, v.18, p.1147–1152, 2008.

HANSEN, T.R. et al. Endocrine actions of interferon-tau in ruminants. *Society for Reproduction and Fertility*, v. 67, p. 325-340, 2010.

HAY, M.F.; MOOR, R.M.; The distribution of 3 β -HSD activity in the graffian follicles of sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 43, p. 313-323, 1975.
HAYASHI, K.; MIYAMOTO, A. Angiotensin II interacts with prostaglandin F2 α and endothelin-1 as a local luteolytic factor in the bovine corpus luteum in vitro. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 1104-1109, 1999.

HAZLERIGG, D.G. et al. Molecular characterization of the long-day response in the Soay sheep, a seasonal mammal. *Current Biology*, v.14, p.334–339, 2004.

HEAP, R.B., LINZELL, J.L. Arterial concentration, ovarian secretion and mammary uptake of progesterone in goats during the reproductive cycle. *Journal of endocrinology*, v.36, p.389–399, 1966.

HEIN, W.R. et al. Flow and composition of lymph from the ovary and uterus of cows during pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 83, p. 309-323, 1988.

HERZOG, K. et al. Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v. 75, n. 3, p. 549–554, 2011.

HERZOG, K. et al. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology*, v. 73, p. 691-697, 2010.

HERZOG, K. et al. E.coli lipopolysaccharide administration transiently suppresses luteal function and structure in dioestrous cows. *Reproduction*, 2012.

HINCKLEY, S.T.; MILVAE, R.A. Endothelin-1 mediates prostaglandin F(2alpha)-induced luteal regression in the ewe. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 1619-1623, 2001.

HOJO, T. et al. Changes in the vasculature of bovine corpus luteum during the estrous cycle and prostaglandin F2alpha-induced luteolysis. *Journal of Reproduction and Development*, v. 55, p. 512–517, 2009.

HU, J. et al. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroidhormones. *Nutrition & Metabolism*, v. 1, p. 7-47, 2010.

IMAKAWA, K. et al. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nature*, v. 330, p. 377-379, 1987.

JACKSON, G.L.; GIBSON, M.; KUEHL, D. Photoperiodic disruption of photorefractoriness in the ewe. *Biology of Reproduction*, v. 38, p.127–134, 1988.

JAFARZADEH SHIRAZI, MR. et al. Differential expressions of RF amide-related peptide, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, and kisspeptin in the hypothalamus of Abadeh ecotype does during breeding and anestrus seasons. *Journal of Neuroendocrinology*, v.26(3), p.186-194, 2014.

JANSON, P.O.; DAMBER, J.E.; AXEN, C. Luteal blood flow and progesterone secretion in pseudopregnant rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 63, p. 491-497, 1981.

JIEMTAWEEBOON, S. et al. Evidence that polymorphonuclear neutrophils infiltrate into the developing corpus luteum and promote angiogenesis with interleukin-8 in the cow. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 9, p. 79, 2011.

KAESSMEYER, S.; PLENDL, J. Angiogenesis and vasculogenesis in the corpus luteum in vitro. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, v. 41, p. 83–101, 2009.

KASTELIC, J.P.; PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic morphology of corporea luteal cavities during the estrus cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology*, v.34, p.487–498, 1990.

KELLY, R.W. et al. Influence of Booroola Merino genotype on the responsiveness of ewes to pregnant mares serum gonadotropin, luteal tissue weights and peripheral progesterone concentrations. *Animal reproduction science*, v. 6, p. 199–207, 1983.

KITO, S. et al. Study on the appearance of the cavity in the corpus luteum of cows by using ultrasonic scanning. *Theriogenology*, v.25, p.325–333, 1986.

KOBAYASHI, S. et al. Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2 alpha. *Journal of Endocrinology*, v. 170, p. 369–380, 2001.

KOJIMA, F.N. et al. Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. *Animal Reproduction Science*, v. 77, p. 187–211, 2003.

LAHOZ, B. et al. Effect of the FecXR polymorphism in the bone morphogenetic protein 15 gene on natural or equine chorionic gonadotropin-induced ovulation rate and litter size in Rasa Aragonesa ewes and implications for on-farm application. *Journal of animal science*, v. 89, p. 30–3522, 2011.

LEBOEUF, B. et al. Efficacy of two types of vaginal sponges to control onset of oestrus, time of preovulatory LH peak and kidding rate in goats inseminated with variable numbers of spermatozoa. *Theriogenology*, v. 60, p. 1371–1378, 2003.

LEGAN, S.J.; KARSCH, F.J. Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. *Biology of Reproduction*, v. 23, p.1061–1068, 1980.

LEHMAN, M.N. et al. Neuronal plasticity and seasonal reproduction in sheep. *European Journal of Neuroscience*, v.32, p. 2152-2164, 2010.

LEHMAN, M.N. et al. Seasonal plasticity in the brain: the use of large animal models for neuroanatomical research. *Reproduction Supplement*, v.59 (Large Mammals as Neuroendocrine Models), p.149–165, 2002.

LEI, Z.M.; CHEGINI, N.; RAO, C.V. Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. *Biology of Reproduction*, v. 44, p. 1148-1156, 1991.

LINCOLN, G.A. Neuroendocrine regulation of seasonal gonadotrophin and prolactin rhythms: lessons from the Soay ram model. *Reproduction Supplement*, v.59, (Large Mammals as Neuroendocrine Models),p.131–147, 2002.

LOPES JR, E.S. et al. Oestrus behaviour and performance in vivo of Saanen goats raised in northeast of Brazil. *Livestock Research for Rural Development*, v.13, n. 6, 2001.

LOZANO, M.T.R. et al. Seasonal variation in ovulatory activity of Nubian, Alpine and Nubian x Criollo does under tropical photoperiod (22° N). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, v.14, p.973 -980, 2011.

MAFFILI, V.V. et al. Indução de estro em cabras da raça Toggenburg com dois diferentes dispositivos intravaginais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, p. 367–372, 2006.

MALPAUX, B. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: NEIL, Neill J.D. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2006. p. 2231–2281.

MALPAUX, B. et al. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *Journal of Biological Rhythms*, v.16, p.336–347, 2001.

MARTEMUCCI, G. et al. Estrus and ovarian response following superovulatory treatment soon after ovulation in dairy goats. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 9., 2008, Querétaro. *Proceedings* Querétaro: F. Torres Acosta, p. 233, 2008.

MAYORGA, I. et al. Superovulation with pFSH in sarda ewes without progestagen synchronization treatment. *Reproduction in domestic animals*, v. 43, n.3, p.193, 2008.

MCCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews*, v.79, n.2, p.263-304, 1999.

MEDAN, M.S. et al. Ovarian dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins, ovarian steroids, and inhibin during the estrous cycle in goats. *Biology of reproduction*, v.69, p.57–63, 2003.

MENCHACA, A. et al. E. Day 0 protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology*, v. 68, p.1111–1117, 2007.

MENCHACA, A. et al. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology*, v. 72, p. 477–483, 2009.

MENCHACA, A. et al. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. *Theriogenology*, v. 58, p.1713–1721, 2002.

MENCHACA, A. et al. Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats. *Theriogenology*, v. 57, p. 1411–1419, 2002.

MENCHACA, A. et al. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 22, p. 113–118, 2010.

MINTON, J.E. et al. Poor reproductive response of anestrous Suffolk ewes to ram exposure is not due to failure to secrete luteinizing hormone acutely. *Journal of Animal Science*, v. 69, p. 3314–3320, 1991.

MIYAMOTO, A. et al. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 29, p. 329-339, 2005.

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. Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. *Journal of Endocrinology*, v. 135, p.103–114, 1992.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; SHIMIZU, T. Impact of angiogenic and innate immune systems on the corpus luteum function during its formation and maintenance in ruminants. *Biology of Reproduction*, v. 13, n. 4, p. 272–278, 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.

MONNIAUX, D. et al. Anti-Mullerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. *Reproduction*, v. 142, n. 6, p. 845–854, 2011.

MONTGOMERY, G. W. et al. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction*, v. 121, p. 843-852, 2001.

MORALES, J.U. et al. Resumption of ovarian activity is modified by non-photoperiodic environmental cues in Criollo goats in tropical latitudes. *Small Ruminant Research*, v.137, p.9-16, 2016.

MOUCHEREC, E.; MOULIN, C.H.S. Comportamento sexual de fêmeas caprinas sem raça definida (SRD) no estado de Minas Gerais. *Informe agropecuário*. v.13, p.3-8, 1987.

MULSANT, P. et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with in-creased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 98, p. 5104-5109, 2001.

MUNDIM, A.V. et al. Influência da ordem e estádios da lactação no perfil bioquímico sanguíneo de cabras da raça Saanen. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.2, p.306-312, 2007.

NICHOLLS, T.J. et al. Possible homologies between photorefractoriness in sheep and birds: the effect of thyroidectomy on the length of the ewe's breeding season. *Reproduction, Nutrition and Development*, v.28, p. 375-385, 1988.

NISHIMURA, R.; OKUDA, K. Multiple roles of hypoxia in ovarian function: roles of hypoxia-inducible factor-related and—unrelated signals during the luteal phase. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 5, 2015.

NISWENDER, G.D. et al. Regulation of luteal function in domestic ruminants. New concepts. *Recent Progress in Hormone Research*, v. 41, p.101-151, 1985.

NITTA, A. et al. Possible involvement of IFNT in lymphangiogenesis in the corpus luteum during the maternal recognition period in the cow. *Reproduction*, v. 142, p.879-892, 2011.

NOGUEIRA, D.M. et al. Comparison of follicular dynamics and hormone profiles in Boer goats examined during the breeding and non-breeding seasons in the tropics of Queensland, Australia. *Small ruminant research*, v. 125, p. 93–100, 2015.

NUNES, J.F. *Produção de caprinos leiteiros: recomendações técnicas*. Maceió: EPEAL/CODEVASP, 1985.

OLIVEIRA, J.F. et al. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein. *Endocrinology*, v. 149, p. 1252-1259, 2008.

OLIVEIRA, M.E.F. et al. Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. *Animal reproduction science*, v. 144, n. 1-2, p. 30–37, 2014.

ORIHUELA, A. et al. Close contact with spontaneously cycling Saint Croix ewes triggers cyclic activity in seasonally anestrous Suffolk ewes. *Animal Production Science*, v.56, p.1816–1819, 2016.

PALMER, E., DRIANCOURT, M.A. Use the ultrasound echography in equine gynecology. *Theriogenology*, v. 13, p. 203-216, 1980.

PAULI, S.A. et al. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor 2 pathway is critical for blood vessel survival in corpora lutea of pregnancy in the rodent. *Endocrinology*, v. 146, p. 1301–1311, 2005.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. *Theriogenology*, v. 28, p.929–936, 1987.

PONCE, J.L. et al. One day of contact with photostimulated bucks is sufficient to induce ovulation in seasonally anestrous goats. *Theriogenology*, v.84, p. 880–886, 2015.

PRAMOD, K.R. et al. Genetics of ovulation rate in farm animals. *Veterinary World*, v. 6, n. 11, p. 833-838, 2013.

PTAK, G. et al. Donor-dependent developmental competence of oocytes from lambs subjected to repeated hormonal stimulation. *Biology of reproduction*, v. 69, p.278-85, 2003.

PUGLIESI, G. et al. Conceptus-induced changes in the gene expression of blood immune cells and the ultrasound-accessed luteal function in beef cattle: how early can we detect pregnancy? *Biology of Reproduction*, v. 91, p. 95, 2014.

REYNOLDS, L.P.; KILLIELEA, S.D.; REDMER, D.A.; Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB Journal*, v. 6, p. 886-892, 1992.

RICHARDSON, B. et al. Regional blood flow and the endocrine response to sustained hypoxemia in the preterm ovine fetus. *Pediatric Research*, v. 40, p. 337-343, 1996.

RIVERA, G.M. et al. Seasonality of estrus and ovulation in Creole goats of Argentina. *Small Ruminant Research*, v.48, p.109–117, 2003.

ROBINSON, R.S. et al. A novel physiological culture system that mimics luteal angiogenesis. *Reproduction*, v. 135, p.405–413, 2008.

ROCHA, R.M.P. et al. Immunolocalization of the Anti-Mullerian Hormone (AMH) in caprine Follicles and the Effects of AMH on *In Vitro* Culture of Caprine Pre-antral Follicles Enclosed in Ovarian Tissue. *Reproduction in Domestic Animals*, v.51, p.212-219, 2016.

RODGERS, R.J.; WATERMAN, M.R.; SIMPSON, E.R. Cytochromes P450_{sc} e P450_{17α} adrenodoxin and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate cytochrome P450 reductase in bovine follicles and corpora lutea: changes in specific contents during the ovarian cycle. *Endocrinology*, v. 188, p. 1366-1374, 1986.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 271–287, 2003.

SANGHA, G.K.; SHARMA, R.K.; GURAYA, S.S. Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small Ruminant Research*, v. 43, n. 1, p. 53–64, 2002.

SHARMA, R.K.; SHARMA, M. Corpus luteum spurium of goat. *The Indian Journal of Animal Sciences*, v.68, p.150-152, 1998.

SCARAMUZZI R.J. et al. A review of the affects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction, Nutrition and Development*, v.46, p.339-354, 2006.

SCARAMUZZI, R.J., MARTIN, G.B. The importance of interaction among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43 n.3, p.129-136, 2008.

SCHAMS, D. et al. Localization and tissue concentration of basic fibroblast growth factor in the bovine corpus luteum. *Endocrine*, v. 2, p.907–912, 1994.

SHIRASUNA, K. et al. Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 43, n. 2, p.198–211, 2012.

SHIRASUNA, K. et al. Prostaglandin F₂α differentially affects mRNA expression relating to angiogenesis, vasoactivation and prostaglandins in the early and mid corpus luteum in the cow. *Journal of Reproduction and Development*, v. 56, p. 428-436, 2010.

SHIRASUNA, K. et al. A blood flow in the corpus luteum acutely increases together with endothelin-1 mRNA expression at early stage of regression during spontaneous luteolysis in the cow. *Biology of reproduction*, v. 71, p.137, 2004.

SHIRASUNA, K. et al. Prostaglandin F₂ α stimulates endothelial nitric oxide synthase depending on the existence of bovine granulosa cells: analysis by co-culture system of endothelial cells, smooth muscle cells and granulosa cells. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 592-598, 2008.

SHRESTHA, H. K. et al. Role of luteinizing hormone in changes in concentrations of progesterone and luteal blood flow during the hours of a simulated pulse of 13,14-dihydro- 15-keto-prostaglandin F₂(α) (PGFM) in heifers. *Biology of Reproduction*, v. 85, p. 482–489, 2011.

SILVA, E. et al. Reproductive performance of Alpine dairy goats in a semi-arid environment of Mexico under a continuous breeding system. *Small Ruminant Research*, v.27, p.79-84, 1998.

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.

SIMÕES, J. et al. Follicular dynamics in Serrana goats. *Animal Reproduction Science*, v.95, p.16–26, 2006.

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

SIMPLÍCIO, A. A. et al. Frequency and duration of oestrous cycle and period in genetically non-descript (SRD) type of goats in the tropical Northeast of Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.21, p.535–540, 1986.

SINGH, S.R. et al. Estradiol negative feedback regulation by Glutamatergic afferents to A15 dopaminergic neurons: variation with season. *Endocrinology*, v.150, p.4663–4671, 2009.

SIQUEIRA, L. G. B. et al. Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 6461–6472, 2013.

SKARZYNSKI, D.J. et al. Administration of a nitric oxide synthase inhibitor counteracts prostaglandin F₂-induced luteolysis in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 1674–1681, 2003.

SMITH, J.T. et al. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, v.150, p.5530–5538, 2009.

SMITH, J.T.; SALEH, S.N.; CLARKE, I.J. Seasonal and cyclical change in the luteinizing hormone response to kisspeptin in the ewe. *Neuroendocrinology*, v.90, p.283–291, 2009.

SMITH, J.T.; MCINTUSH, E.W.; SMITH, G.W. Mechanisms associated with corpus luteum development. *Journal of Animal Science*, v. 72, p. 1857–1872, 1994.

SOMCHIT, A. et al. The effect of short-term nutritional supplementation of ewes with lupin grain (*Lupinus luteus*), during the luteal phase of the estrous cycle on the number of ovarian follicles and the concentrations of hormones and glucose in plasma and follicular fluid. *Theriogenology*, v.68, n.7, p.1037–1046, 2007.

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, n. 1–2, p. 50–55, 2011.

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

TARSO, S. G. S.; APGAR, G. A.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L. I. Relationships between follicle and corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in beef cows and heifers: preliminary results. *Animal Reproduction*, v.13, p.81-92, 2016.

THIERY, J.C. et al. Dopaminergic control of LH secretion by the A15 nucleus in anoestrous ewes. *Journal of reproduction and fertility Supplement*, v.49, p.285–296, 1995.

THIERY, J.C. et al. Turnover rate of cerebrospinal fluid in female sheep: changes related to different light-dark cycles. *Cerebrospinal Fluid Research*, v.6, p.6–9, 2009.

THIERY, J.C. et al. Concentrations of estradiol in ewe cerebrospinal fluid are modulated by photoperiod through pineal-dependent mechanisms. *Journal of Pineal Research*, v.41, p.306–312, 2006.

THORBURN, G.D.; SCHNEIDER, W. The progesterone concentration in the plasma of the goat during the oestrous cycle and pregnancy. *Journal of endocrinology*, v.52, p. 23–36, 1972.

TORRES-ROVIRA, L. et al. Predictive value of antral follicle count and anti-Mullerian hormone for follicle and oocyte developmental competence during the early prepubertal period in a sheep model. *Reproduction fertility and development*, v. 26, p. 1094-1106, 2014.

TORRES-ROVIRA, L. et al. Postnatal pituitary and follicular activation: a revisited hypothesis in a sheep model. *Reproduction*, v.151, p.215-225, 2016.

TRICOIRE, H. et al. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology*, v.143, p.84–90, 2002.

TURNER, E.C. et al. Conditional ablation of macrophages disrupts ovarian vasculature. *Reproduction*, v. 141, p. 821-831, 2011.

TURNER, H.N. *Origins of the CSIRO Booroola*. In: Piper, L.R., Bindon, B.M., Nethery, R.D. (Eds.), *The Booroola Merino—Proceedings of a Workshop held at Armidale, NSW. 24–25 August 1980*. CSIRO, Melbourne, Australia, p. 1–7, 1982.

UTT, M.D.; JOHNSON, G.L.; BEAL, W.E. The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. *Theriogenology*, v. 71, p. 707–715, 2009.

VECCHIO, D. et al. Corpus luteum development and function and relationship to pregnancy during the breeding season in the Mediterranean buffalo. *Theriogenology*, v. 77, n. 9, p. 1811-1815, 2012.

VEIGA-LOPEZ, A. et al. Follicular wave status at the beginning of the FSH treatment modifies reproductive features in superovulated sheep. *Reproductive Biology*, v. 6, p. 243–264, 2006.

VEIGA-LOPEZ, A. et al. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. *Theriogenology*, v. 63, p.1973–1983, 2005.

VIGUIÉ, C. et al. Thyroid hormones act primarily within the brain to promote the seasonal inhibition of luteinizing hormone secretion in the ewe. *Endocrinology*, v.140, p.1111-1117, 1999.

VIGUIÉ, C. et al. Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone (GnRH) secretion by melatonin in the ewe. I. Simultaneous delayed increase in GnRH and luteinizing hormone pulsatile secretion. *Biology of reproduction*, v.52, p.1114–1120, 1995.

VIGUIÉ, C. et al. Potential for polysialylated form of neural cell adhesion molecule-mediated neuroplasticity within the gonadotropin-releasing hormone neurosecretory system of the ewe. *Endocrinology*, v.142, p.1317–1324, 2001.

VISSER, J.A.; THEMMEN, A.P. Role of anti-Müllerian hormone and bone morphogenetic proteins in the regulation of FSH sensitivity. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 382, p. 460–465, 2014.

WANG, Y.; OLIVER, G. Current views on the function of the lymphatic vasculature in health and disease. *Genes & Development*, v. 24, p. 2115-2126, 2010.

WEBSTER, J.R. et al. Role of the thyroid gland in seasonal reproduction: III. Thyroidectomy blocks seasonal suppression of gonadotropin-releasing hormone secretion in sheep. *Endocrinology*, v. 129: p.1635-1643, 1991a.

WEBSTER, J.R. et al. Role of the thyroid gland in seasonal reproduction: II. Thyroxine allows a season-specific suppression of gonadotropin secretion in sheep. *Endocrinology*, v.129, p.176-183, 1991b.

WILES, J.R. et al. The effect of leptin on luteal angiogenic factors during the luteal phase of the estrous cycle in goats. *Animal Reproduction Science*, v. 148, n. 3-4, p. 121-129, 2014.

WOAD, K.J. et al. FGF2 is crucial for the development of bovine luteal endothelial networks in vitro. *Reproduction*, v.138, p. 581–588, 2009.

WOLF, E. et al. Embryo–maternal communication in bovine: strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 38, p. 276–289, 2003.

YANG, L. et al. Up-regulation of expression of interferon-stimulated gene 15 in the bovine corpus luteum during early pregnancy. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 1000-1011, 2010.

YAMASHITA, H. et al. Effect of local neutralization of basic fibroblast growth factor or vascular endothelial growth factor by a specific antibody on the development of the corpus luteum in the cow. *Molecular Reproduction and Development*, v. 75, p. 1449–1456, 2008.

ZARAZAGA, L.A. et al. Effect of plane of nutrition on seasonality reproduction in Spanish Payoya Goats. *Animal Reproduction Science*, v.87, p. 253-267, 2005.

3. JUSTIFICATIVA

A espécie caprina apresenta importante papel socioeconômico no Nordeste brasileiro e vem se consolidando em outras regiões do país. No Sudeste, a produção de leite de cabra é caracterizada por sistemas de produção intensivos do tipo familiar ou por pequenos produtores localizados em áreas próximas aos centros urbanos. Nesses sistemas, são explorados animais de raças leiteiras especializadas, como a Saanen – considerada como mais produtiva. Entretanto, diversos fatores vêm impossibilitando a elevação da produtividade e lucratividade na cadeia produtiva devido ao potencial genético dos rebanhos, a sazonalidade da produção, a qualidade das forrageiras tropicais, o clima, o manejo, o intervalo de partos, a idade ao primeiro parto, o controle das enfermidades, entre outros. Assim, observa-se que grande parte das deficiências pondera no âmbito reprodutivo. Devido a isso, tal espécie e raça foram escolhidas como objeto de estudo da tese.

Raças especializadas europeias, oriundas de clima temperado, são utilizadas na tentativa de se elevar os índices zootécnicos e a lucratividade da caprinocultura leiteira no Brasil. É esperado que a fisiologia da reprodução destes animais, quando manejados em condições tropicais, sejam divergentes das condições temperadas. Na região Sudeste, estudos acerca da atividade reprodutiva em caprinos leiteiros têm sido pontuais, realizados na estação ou contraestação reprodutiva, sem um acompanhamento prospectivo do plantel. Genericamente, tem sido descrito o comportamento sexual do verão ao inverno. Todavia, não existem relatos científicos locais a respeito do comportamento reprodutivo anual em rebanhos leiteiros de raças europeias. Tais respostas biológicas são importantes no intuito de reconhecer o padrão de estacionalidade reprodutiva e repensar nas atuais ferramentas de manipulação do ciclo estral adotadas em caprinos.

O Brasil é líder na pesquisa e aplicação das biotécnicas de reprodução assistida veterinária, acelerando os ganhos no melhoramento animal e produtividade nos sistemas de produção tropicais. Entretanto, para o uso consciente destas ferramentas, torna-se imprescindível o conhecimento do comportamento e da fisiologia reprodutiva da fêmea caprina na região onde ela se encontra, principalmente, ao se tratar de raças exóticas, como a Saanen –

Suiça. A ultrassonografia Doppler colorido e o ensaio hormonal de progesterona são importantes ferramentas no intuito de caracterizar, respectivamente, o estado ovariano folicular e luteal junto de sua funcionalidade. Já técnicas, como a MOET, têm sido utilizadas para aumentar a intensidade de seleção e os ganhos genéticos do rebanho. Contudo, o processo de MOET carece de maior refinamento, pois os resultados obtidos ainda são inconsistentes devido ao chamado efeito intrínseco ou individual das respostas dos animais aos tratamentos hormonais. Logo, novas metodologias devem ser propostas visando a elucidação de tal efeito e a identificação de fêmeas caprinas com maior potencial para a doação de embriões.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Capítulo 2

- O fluxo vascular luteal é mais eficiente para prever a funcionalidade luteal quando comparado à mensuração biométrica do corpo lúteo de cabras da raça Saanen.
- O fluxo vascular luteal aumenta no período do reconhecimento materno da gestação quando comparado a fase lútea estática em cabras gestantes da raça Saanen.

Capítulo 3

- As cabras da raça Saanen exibem um perfil de estacionalidade reprodutiva distinto ao serem manejadas sob clima tropical (22 °S) quando comparadas as fêmeas manejadas sob condições temperadas.
- A ordem de parto e, conseqüentemente, a idade dos animais modificam o padrão de estacionalidade reprodutiva de cabras da raça Saanen manejadas sob clima tropical (22 °S).
- O peso corporal, escore de condição corporal (ECC), índices meteorológicos e perfil metabólico modificam a estacionalidade reprodutiva de cabras da raça Saanen manejadas sob clima tropical (22 °S).

Capítulo 4

- O protocolo de triagem com eCG é eficaz para identificar doadoras de embrião caprinas da raça Saanen melhores responsivas aos protocolos de superovulação tradicionais com FSH.
- A presença de um conjunto de folículos pequenos e folículos grandes influenciam positiva e negativamente, em respectivo, na resposta a ser obtida pelas doadoras de embrião caprinas da raça Saanen no momento do estímulo superovulatório.

5. OBJETIVOS

5.1 Geral

- O presente estudo teve por objetivo caracterizar em cabras da raça Saanen a dinâmica luteal ao longo de um ciclo estral; a estacionalidade reprodutiva durante um ano, além de testar um protocolo de triagem hormonal para a seleção de melhores doadoras caprinas de embrião em protocolos de MOET.

5.2 Específicos

- Elucidar os eventos morfofisiológicos luteais envolvidos durante um ciclo estral completo de cabras gestantes e não gestantes.
- Avaliar o potencial da US color-Doppler e no modo-B na previsão de pontos de corte para a determinação da funcionalidade luteal.
- Acompanhar a estacionalidade reprodutiva durante o período de um ano em cabras pluríparas, primíparas e nulíparas, assim como a influência de variáveis ambientais, metabólicas e ponderais sobre o padrão de estado cíclico dos animais.
- Detectar o potencial intrínseco de doadoras de embriões, junto a influência do estado ovariano, a partir de um protocolo superovulatório de triagem com eCG seguido pelo protocolo tradicional, com FSH.

6. CAPÍTULO 2

Luteal dynamic in dairy goats: luteal vascularization, size and progesterone profile and luteal functionality

Dinâmica luteal em cabras leiteiras: fluxo vascular luteal, biometria luteal, concentração plasmática de progesterona e funcionalidade luteal

Artigo submetido ao periódico: Theriogenology

Em: Novembro de 2016

Qualis: A2 – Medicina Veterinária

Luteal dynamic in dairy goats: luteal vascularization, size and progesterone profile and
luteal functionality

Mario Felipe A. Balaro^{a*}; Alex S. Santos^a; Luiz Fernando G. M. Moura^a;
Jeferson F. Fonseca^b; Felipe Z. Brandão^a

^a *Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil Filho, 64, zip-code: 24320-340, Niterói, RJ, Brazil.*

^b *Embrapa Goats and Sheep, Rodovia MG 133, km 42, CEP 36155-000, Coronel Pacheco, MG, Brazil.*

* Corresponding author. Tel: +55 21986978686

E-mail address: mariobalaro@hotmail.com (M.F.A. Balaro)

Abstract

The study aimed to assess the luteal dynamic of pregnant and non-pregnant Saanen goats throughout an estrus cycle by B-mode and Color Doppler ultrasonography (US) associated with P4 hormonal assay. Furthermore, a cutoff point to determine the *corpus luteum* (CL) functionality by luteal biometry measurement and luteal blood flow assessment. Ultrasound assessment were carried out daily throughout an entire estrous cycle (21 days) in 23 Saanen goats pre-synchronized and inseminated in the breeding season. The plasmatic P4 concentration was daily determined by radioimmunoassay. Luteal biometry (LB) parameters (diameter, area and volume) were measured using the maximum area of a cross section of the CL. Luteal blood flow (LBF) assessment was performed subjectively by percentage of area of colored pixels and objectively by calculating the number of the colored pixels. Eventually, 45.0% (9/20) and 55.0% (11/20) of goats got pregnant and nonpregnant, respectively. The LB and LBF demonstrated value stabilization at the 9th day of the estrus cycle and maximum values in the 12th and 13th day of the estrous cycle, respectively. LB presented a progressive decrease in the luteal regression phase, while the LBF decreased abruptly in association with the P4. The LBF values were more reliable in predict the luteal functionality when compared to the LB data. The number of colored pixels predicted confidently values of P4 > 1.0 ng/mL, reaching only 17% of the maximum values and a 1200 colored pixels as a minimum cutoff point when compared to the use of 41% of the maximum values and a minimum luteal area of 110 mm² as cutoff point for P4 > 1.0 ng/mL. In conclusion, the LBF assessment is more informative about the CL functionality throughout the complete luteal phase when compared to the LB. The number of colored pixels is indicated for research regarding the luteal functionality due to their greater correlation with P4 values. In addition, the luteal subjective evaluation can be used under field conditions due to a greater convenience and similar pattern of correlation with the P4.

Keywords: Color doppler ultrasound, does, luteinized-persistent follicle, number of colored pixels, progesterone.

1. Introduction

Ultrasonography (US) has been applied to reproductive tract of domestic animals since the early 1980s and is established as a practical tool on the real time follicular dynamics elucidation, ovulation phenomenon and luteal dynamics [1]. The *corpus luteum* (CL) morphofunctional understanding and its relationship with P4 concentration in small ruminants began in the late 1990s by advances in transrectal US, [2-4]. However, the first elucidation using B-Mode US on CL in goats was made by Simões et al. [5] which were characterized the echogenicity, CL number and its diameter (mm; presence of luteal cavity or not) throughout the estrus cycle and their relationship with P4 values.

Circulating P4 concentrations determined by RIA or ELISA is the gold standard assay to assess luteal functionality [6]. Nevertheless, this biological diagnosis has two major limitations: high cost and timing between blood collection and results. Therefore, new methodologies have been suggested as alternative to P4 levels. The B-mode US allows luteal area evaluation, luteal volume and luteal diameter and has been proposed by many authors as a technique with promising potential to assess luteal functionality [5,7,8]. However, it is not clear whether these luteal biometry measurements would be the most appropriate parameter for the CL functionality, particularly in the luteal regression phase (luteolysis), in which the CL size decreases gradually when compared to the sharp decrease in P4 values [5,8]. Thus, the color-Doppler US appears as a promising technique because P4 values remains related with the luteal blood flow (LBF) [9-11]. In this context, new studies have demonstrated promising correlations and cutoffs through the analysis of LBF with P4 in sheep, cattle and horses [12-15].

It has been postulated that LBF can be measured subjectively by color-Doppler US using a luteal vascularization score (1-4) or estimating the vascularization percentage (0-100%) between the total luteal area and the area completed by blood vessels in cows [16,17]. However, as these techniques have influence of operator's experience and a low repeatability degree among operators, it has been proposed an objective assessment (semi-quantitative) by evaluating the number of colored pixels [13,14,17]. Regarding this technique, image analysis softwares assisted by computer are embraced, and in

accordance with [18], the values obtained have a high intra-observer reproducibility (icc: 0.90) and thus would be a good alternative to the subjective LBF evaluation. Moreover, the LBF is also being used for the early pregnancy diagnosis in cattle and some reports have claimed LBF increases in the third week after ovulation in pregnant cows due to the maternal-fetal recognition [14,19].

Consequently, this study aimed to assess the luteal dynamic of pregnant and non-pregnant Saanen goats throughout the estrous cycle by B-mode and color-Doppler US associated with P4 hormonal assay. Furthermore, it was proposed a cut-off point for the CL functionality by LB measurement and LBF with the P4 values.

2. Material and Methods

This research was reviewed and approved by the Animal Care Committee of Universidade Federal Fluminense (number 374) and was conducted under the ethical principles of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science.

2.1 Location and experimental animals

The study was carried out at natural breeding season (April) in a dairy goat farm in Niterói, State of Rio de Janeiro (Latitude 22° 52' 30" south; Longitude 43° 02' 15" west). A total of 23 Saanen goats were kept under intensive management and received daily 1.2 kg/goat of concentrate (homemade mixture with 22% crude protein), 3.0 kg/goat of damp barley and 4.0 kg/goat of chopped elephant grass. Water and mineralized salt (Caprinofós, Tortuga, São Paulo, Brazil) were provided *ad libitum*.

2.2 Estrous synchronization and US assessment

All twenty three goats had the estrus synchronized using two doses of 37.5 µg of d-clorprostenol (Prolise®, Tecnopec LTDA, São Paulo, Brazil) administered intramuscularly (im) with seven days apart. The does were inseminated once, 24 hours after estrous detection, with frozen semen according to the adapted methodology by Esteves et al [20].

From the first day of the estrous cycle (considered as after ovulation time), all goats were daily monitored by US (Sonoscape S6, SonoScape, Yizhe Building, Yuquan Road, Shenzhen, China) coupled to a linear transducer of 7.5 MHz (transrectal way). B-mode and color-Doppler mode videos from both ovaries were recorded for subsequent evaluations. From B-mode frozen images were measured luteal area (mm²), luteal diameter (mm) and luteal volume (cm³) (calculated from the sphere formula). Upon color-Doppler videos were collected images corresponding to the CL cross section in its greater diameter for subjective evaluation (area of vascularization in percentage; 0-100%; 10% interval). The objective analysis was performed by the assessment of the quantity and intensity of color dots (pixels). This was carried out by color-Doppler mode in an image previously selected, extracted and processed using Adobe Fireworks software. The Image J software was used, in sequence, to quantify the number of colored pixels of the image [21, 22]. The intensity of colored pixels was calculated on the number of colored pixel data by the Excel Office software. The Doppler settings used in the luteal assessments follows in sequence: 20% colors gain, pulse repetition frequency (PRF) of 1.0 kHz, 7 cm of depth and wall filter (WF) of 75 MHz. The end of US evaluation was defined when goats showed luteolysis and subsequent ovulation or the indication of an early gestation (anechoic fluid into uterus and embryo vesicle) on the 21th estrous cycle day. Furthermore, the occurrence of premature regression of CL (PRCL) was defined as a CL without luteal blood flow by US in the following days after ovulation.

2.3 Progesterone assay

Blood was daily collected by jugular venipuncture into vacuum tubes (Vacutainer[®], BD, Juiz de Fora, Brazil) containing heparin to obtain plasma. The plasma was immediately separated by centrifugation at 2600 X g for 15 minutes and stored in microtubes at -20°C for subsequent analysis. P4 concentration was analyzed using solid-phase radioimmunoassay kits (Beckman Coulter[®], Immunotech, Marseille, France). The assay sensitivity and intra-assay coefficient was 0.05 ng/mL and 10%, respectively. All data were found within the maximum and minimum points of the curve.

2.4 Statistical analysis

The data were analyzed using the SAEG statistical software (SAEG 9.0, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil). Lilliefors test was used to verify the normality of variables. Data were analyzed according to the estrus cycle period: luteogenesis (days 0-15) and luteolysis (grouped synchronous from - 48 h to 72 h after luteolysis). The luteogenesis period was based on ovulation time and P4 plasma concentrations. The luteolysis time was based on the occurrence of functional and structural luteolysis, which is defined by the following criteria: A) a reduction of 25% in the luteal area compared to the day before static luteal phase; B) a reduction of 75% in the progesterone plasma concentrations compared to the day before static luteal phase; C) a CL with blood flow signals covering $\leq 25\%$ of the total luteal area. Criteria A and C were based on previous reports [23] in cattle. Due to several goats presented double or triple ovulation associated with the presence of cavity CL, the following biometric luteal measurements were performed from: (1) greater CL; (2) CL average; (3) greater CL corrected by the luteal cavity and; (4) sum of CL. The Pearson Correlation was adopted to compare the pre-cited luteal indexes with P4 levels. From results, it was opted to use the value of the greater CL because it had better correlation with P4 plasma when compared to others measurements. Parametric variables were analyzed using a mixed model procedure for repeated measures and the Fisher's Least Significant Difference (LSD) test was used to compare means. The Pearson Correlation Coefficient (PCC; r) and Simple and Multiple Linear Regression Analysis (SLR; r^2) were used to compare P4 values with luteal data (B-mode and Color Doppler mode) at the luteogenesis, Luteolysis and CL maintenance after maternal recognition of pregnancy. Categorical data were assessed by the chi-square test. For all tests, $p < 0.05$ was considered significant. Results among $p \leq 0.10$ to $p > 0.05$ were considered as a tendency.

The repeatability of different cutoffs was compared by calculating the sensitivity (denoted in %) defined as the probability of having a CL above the LB/LBF cutoff when progesterone levels are above 1 ng/mL. The specificity (denoted in %) was defined as probability of having a CL below the LB/LBF cutoff when progesterone levels are below than 1 ng/mL. The positive predictive value (+PV; denoted in %) was defined as the probability of having

progesterone levels above 1 ng/mL if LB/LBF was above the cutoff. The negative predictive value (–PV; denoted in %) was defined as the probability of having progesterone levels below 1 ng/ mL if LB/LBF was below the cutoff. The kappa coefficient was used to assess the degree of agreement between the cutoff set and the gold standard test for P4 detection (radioimmunoassay).

3. Results

3.1 Luteal morphophysiology

Forty-six ovulations were observed in the onset of estrus cycle with a mean of 2.0 ± 0.7 ovulations per goat and a total of 6 single, 11 double and 6 triple ovulations per goat. The first visualization time of all CL by Color Doppler US was at first day of the estrous cycle. No differences were found regarding to CL visualization when the ovary had one or more CL. PRCL occurred in 13.0% (3/23) of the goats and they were withdrawn from the study. Eventually, 45.0% (9/20) and 55.0% (11/20) of the goats became pregnant and non-pregnant, respectively. Non-pregnant goats had a tendency ($p=0.07$) to have single ovulations (66.0 vs. 11.0%) and lower number of CL (1.7 ± 0.7 vs. 2.4 ± 0.7) when compared with the pregnant ones. Interestingly, it was found luteinized-persistent follicles (LPF) between 3th and 4th day of the estrous cycle in 20.0% (4/20) of the goats. Among them, 75.0% (3/4) got pregnant. In the figure 1, it can be observed the comparison between a normal CL and LPF in three goats. It is noticed that in pregnant goat 1 and 2, at the luteal static phase, the origin of both (CL and LPF) was difficult to differentiate due to the luteal volume gain of the luteinized follicle. However, the luteinized follicle from the goat 3 remained with an ultrasound luteinized-follicular cyst appearance throughout the estrus cycle until the luteolysis.

3.2 Luteogenesis, Luteolysis and CL maintenance

LB and LBF data along with P4 concentrations in luteogenesis are presented in figure 2. P4 concentrations differed throughout luteogenesis period and increased on 8th day (12.3 ± 3.1 ng/mL) with maximum values at the 14th day (14.9 ± 2.2 ng/mL). It was also observed an effect in the number of CL (1, 2, or 3) on the average production of P4. Considering the whole luteogenesis (D0-

D15), goats with two or three CL showed a greater P4 average when compared with single ovulated goats (10.3 ± 5.7 vs. 8.8 ± 4.8). It was not observed any effect on presence of luteal cavity over P4 concentrations. LB measurements differed through luteogenesis. The luteal volume, diameter and area showed values stabilization on the 9th day ($1.24 \pm 0.38 \text{ cm}^3$; $13.2 \pm 1.5 \text{ mm}$; $160.9 \pm 40.4 \text{ mm}^2$) with a greater mean values on the 12th day ($1.58 \pm 0.58 \text{ cm}^3$; $14.3 \pm 1.9 \text{ mm}$; $138.0 \pm 28.4 \text{ mm}^2$). The number of colored pixels and total pixel intensity also differed throughout luteogenesis period and showed a stabilization in their values on the 9th day ($40.0 \times 10^2 \pm 12.0 \times 10^2$; $52.3 \times 10^4 \pm 14.1 \times 10^4$) with greater mean values on the 13th day ($47.4 \times 10^2 \pm 11.5 \times 10^2$; $55.2 \times 10^4 \pm 13.4 \times 10^4$). The subjective evaluation showed stabilization on the 7th day (70.0%) with a peak on the 13th day (75.0%). Moreover, the subjective evaluation also differed according to the number of CL (1, 2, or 3) in the luteogenesis. Goats with three CL demonstrated lower percentage in the subjective evaluation when compared to goats with 2 or 1 CL. (55.0 vs. 60.0 %).

Data regarding luteolysis of non-pregnant goats are shown in figure 3. The P4 concentration showed a sharp significant drop (~75%) within the first 24 h after the luteolysis onset coming to baseline values (<1.0 ng/mL) after 72 h. The decrease of LB data was gradual although significant within the first 24 h (Reduction of: VCL: 53%; ACL: 38%; DCL: 20%). From time 0, differences in luteal diameter and luteal area were found only at 72 h later. Nonetheless, LBF data showed a drastic significantly drop in the first 24 h (Reduction of: PIX: 95%; INTPIX: 96%; SUBJ: 84%). From the time 0, differences were found in these all measures, at 24 h later.

LBF data along the P4 values in the period of maternal recognition of pregnancy (maintenance of the CL) in pregnant goats can be observed in Figure 4. Higher P4 values were found on the 16th day of the estrous cycle, when compared to the 18th, 19th and 20th day of the cycle.

3.3 LB and LBF correlations with P4

From correlations described in Table 1, unlike the Luteolysis, it was observed that along growth phase of luteogenesis (D0-D9), LB data showed a greater correlation with P4 values when compared to LBF measurements. Interestingly, in the static phase of luteogenesis (D10-D15) and the early

pregnancy (D16-D21), it was only found significant correlations between the LB and P4.

By observing the degree of P4 correlation with each CL, when in the presence of two or three CL, it was observed that greatest CL and intermediate CL had greater correlations with P4 values when compared to the third, smallest, CL (table 2).

In order to clarify the cause of the third CL lower correlation with P4 comparing with others CL, it were made new correlations sorting out the origin of this third luteal tissue: from triple ovulation or the persistent follicle luteinization. From data presented in table 3, it was found that the CL from a triple ovulation had a greater correlation with the P4 than compared to luteal tissue coming from luteinized-persistent follicles.

Equations to estimate P4 values from the luteal diameter, number of colored pixels and subjective evaluation of the greatest, intermediate and smallest CL are demonstrated in table 4. Only luteal diameter allowed generating equations of moderate correlations. However, stronger correlations were obtained when the number of colored pixels and the subjective evaluation in the equation were associated. For goats with single ovulation, the use of subjective evaluation, as an independent vascular variable, along the luteal diameter generated better results when compared to the use of colored pixels number. Instead, in goats with 2 or 3 CL, the number of pixels as independent vascular variable was slightly more effective in determining the P4 values in association with the luteal diameter. Furthermore, best equations to estimate P4 were obtained from goats with 1 or 3 CL when compared to goats with 2 CL.

3.4 Cutoffs for obtaining a functional CL

To compare the usefulness of LB an LBF data to evaluate the luteal functionality, all respective values were placed into six subgroups in proportion and together with the P4 values in table 5. This approach revealed a stronger discriminatory power for the LBF data in comparison with the LB data. The use of variable SUBJ reached 33% of the maximum values to indicate the reliability of the $P4 > 1.0$ ng/mL. Therefore, 30% of the minimum vascular area was defined as the cutoff to differentiate between a non-functional and functional CL. Related to this cut, the sensitivity, specificity, PPV, NPV, and Kappa were 91%,

100%, 100%, 53% and 0.65 (good agreement) respectively. Regarding the Pixel number, it was used 17% of maximum values and 1200 pixels was the cutoff for a functional CL. The respective values of sensitivity, specificity, PPV, NPV, Kappa were 88%, 100%, 100% and 45% and 0.57 (moderate agreement). About the luteal area, it was used 41% of the maximum values and 110 mm² was the cutoff for a functional CL. The respective values of sensitivity, specificity, PPV, NPV, Kappa were 70%, 100%, 100% and 22% and 0.26 (fair agreement). Considering the luteal diameter, it was used 53% of the maximum values and 9.0 mm was the cutoff for a functional CL. The respective values of sensitivity, specificity, PPV, NPV, Kappa were 89%, 81%, 98% and 39% and 0.47 (moderate agreement). Finally for the luteal volume, it was used 37% of the maximum values and 1.0 cm³ was the cutoff for a functional CL. The respective values of sensitivity, specificity, PPV, NPV, Kappa were 61%, 100%, 100% and 18% and 0.20 (fair agreement).

4. Discussion

In this study, B-mode and color-Doppler US were used in association with plasma P4 concentrations in order to elucidate the luteal functionality throughout the estrous cycle in Saanen goats that got pregnant or not. Within our knowledge, this is the first study in goats that contemplates these technologies in order to further biological elucidations, correlations and cutoffs for the luteal functionality.

All CL were identified at the first day of estrous cycle due to the color-Doppler US. This fact has been already verified by [15] in ewes using the same technique. Also, it was found that half of CL evaluated had luteal cavity and their presence did not influence on P4 values, as already discussed by [5]. The trend in the difference of the ovulation rate between goats that did or did not get pregnant was an expected result once these data are related to a greater chance of fertilization and pregnancy. Although the ovulation rate in goats is affected according to breed, season of the year, reproductive management and nutrition [24-26], similar rates (~1.8) were reported for Saanen goats induced during out-of-season breeding [27]. The occurrence of LPF coming from the ovulation time between 3th and 4th day of the estrous cycle was an unexpected

finding which occurred in 20.0% (4/20) of animals. A possible explanation for such biological finding revolves around the lower P4 concentrations during metaestrus and early diestrus phase. It is known that the mechanism which P4 inhibits the follicular growth, would be through the LH pulse frequency abolition, responsible for the final follicular growth [2, 28-30]. Moreover, through metaestrus and early diestrus, the serum concentration of LH and the pulse frequency of LH gradually decrease, while the pulse duration of LH and pulse rate of FSH increase which could corroborate to the luteinization of such persistent follicles [31, 32].

The changes in the P4 peak and stabilization in the LB data throughout luteogenesis period are in accordance with the previously reported data [5, 8, 33]. Unsurprisingly, the partial conclusion regards to CL functionality can be taken by the measurement of LB data. The LBF measure had more complete correlation than compared to the LB data in respect to the all-functional state of the CL. This can be attributed to: (1) stronger P4 correlations with the subjective evaluation and number of colored pixels in luteogenesis (growth phase) and luteolysis; (2) similarity in the ascension and stabilization values among the LBF data and P4 throughout the estrous cycle and especially at luteal regression; (3) good cutoff for the assessment of luteal functionality from a maximum specificity and excellent sensitivity in the number of pixels (1200 pixels; sensitivity: 88%; specificity: 100%) and subjective evaluation (30%; sensitivity: 91%; specificity: 100%). It is important to highlight that the cutoff described can be adopted in order to evaluate the luteal functionality in female embryo recipients aiming to increase pregnancy rates after embryo transfer by surgical or transcervical way in programs of multiple ovulation and embryo transfer (MOET) in goats [34].

This close correlation between the LBF and P4, emphasizes the importance of a good blood supply as a *sine qua non* condition for a good P4 production. The angiogenesis is considered an important process in the luteal tissue development, where the blood supply and oxygen is required for the ideal steroidogenesis [11]. Moreover, most steroidogenic cells are in close contact with capillaries [9, 10]. In a recent study in goats, it was demonstrated that angiogenesis occurs intensively at the beginning of the luteal phase (day 4) due to the abundance of rough endoplasmic reticulum in the cytoplasm of

endothelial cells with a loose arrangement in the network of capillaries [33]. Moreover, in the middle (12th day) and late (16th day) stages of CL, angiogenesis does not occur more due to stabilization of capillaries with pericytes and mature endothelial cells [33, 35, 36]. In the present study, it was found that throughout the luteal static phase, the luteal size reached maximum size at the 12th day while the blood flow data and P4 achieved it at the 13th and 14th day, respectively. Thus, although the angiogenesis may no longer occur in this period, these results are corroborated by [37] who observed that between the 6th and 12th day of the estrus cycle in cattle, there would be an increase in the vascular space (~25%) while the non-luteal cells, as the smooth muscles, decreased over this period by 15%. So, the increase in the vascular flow at this middle to late luteal stage seems to be caused predominantly by a vasodilation of arterioles and not by a greater local vascularization.

In dairy cows, an increase in the luteal blood flow at the 17th and 18th day of the estrous cycle has been reported before the luteolysis with a subsequent drop in P4 values a day later [38, 39]. These authors suggested that the release of uterine PGF2 α could stimulates the production of nitric oxide by arterioles in the peripheral vasculature of the mature CL, causing vasodilation and the triggering of the luteolytic cascade and the P4 drop. However, the current study, in goats, and other one in cattle [13] found no increase in vascular flow in this period preceding the luteolysis. As pre-mentioned above, this increase lack happened even the data collection being carried out with the same frequency of previous studies.

The luteolysis is characterized by the loss of the steroidogenesis ability (functional luteolysis) and the morphological regression (structural luteolysis) of the CL. In this experiment, the P4 values decrease occurred to equitable LBF and more steeply in comparison to LB regression (P4: 75,0 %; LBF: 95,0 % and; LB: 35,0%, of reduction in the first 24 h). Other authors also described the same biological findings in previous studies [5, 8, 13]. The temporal difference between the LB and LBF data can be explained by the events of luteolysis. Initially, the main changes are induced by PGF2 α that causes a disorder in the steroidogenic activity due to a reduction in the blood flow and availability of steroid precursors (functional luteolysis). As result, the structural luteolysis

occurs gradually, because it is mediated by an apoptotic cascade of cell death and phagocytosis [40, 41].

Concerning the recognition of maternal pregnancy in goats that got pregnant, previous studies observed an increase in the LBF from the 15th to 18th of the estrous cycle in cows that got pregnant [14]. The authors attributed this increase to the transfer of the embryo signal for the maintenance of the CL and the maternal recognition of pregnancy. However, in the current study did not detect such LBF alteration among the 15th and 20th day of the estrous cycle in goats.

Regardless the number of CL per goat, all contributed similarly in steroidogenesis as the average correlations obtained by luteal diameter ($r \sim 0.73$; $p < 0.01$) and number of colored pixel ($r \sim 0.72$; $p < 0.01$) with the P4. However, it was obtained a low P4 correlation with the luteinized-persistent follicles. In this way, could be hypothesized that these structures could act equally to a luteinized-follicle cysts with respect to steroidogenic production of P4 [42], even though with certain endocrine disorders to further elucidation.

Luteal diameter achieved best correlations with P4 in luteogenesis growth phase ($r = 0.78$; $r^2 = 0.57$; $p < 0.01$) and in the early prenanacy ($r = 0.37$; $r^2 = 0.12$; $p < 0.01$). Luteal volume and luteal area were more correlated with P4 levels at luteolysis ($r = 0.69$; $r^2 = 0.46$; $p < 0.01$). In general, the simple measurement of the luteal diameter can be effectively adopted in studies using the B-mode US. Regarding to the measurement of LBF, it were also obtained good correlations between the number of colored pixels and the subjective evaluation with the P4 values in luteogenesis growth phase ($r = 0.71$; $r^2 = 0.45$; $p < 0.01$) and luteolysis ($r = 0.80/0.78$; $r^2 = 0.61/0.59$; $p < 0.01$). Previous studies by Simões et al. [5] and Arashiro et al. [8] found lower correlations between P4 and the luteal area in luteogenesis ($r = 0.63$ and $r = 0.63$) and luteolysis ($r = 0.48$ and $r = 0.50$) in goats. Part of this result can be explained by the lower US technology at that time. Besides, Figueira et al. [15] using a vascular luteal area as parameter in the color-Doppler US also did not reach promising correlations (luteogenesis: $r = 0.22$; luteolysis: $r = 0.48$) in sheep such found in the current study. The measurement of vascular luteal area, previously proposed by [15], may be replaced by a simple subjective evaluation (scale: 0-100%) or objective (number of colored pixels) to achieve better correlations with

P4. Lastly, some studies have shown similar results with those found in the present study to correlate the P4 with the area of colored pixels and the luteal area (B-mode) in Luteolysis ($r= 0.77$ and $r= 0.71$, respectively) in cattle [13].

In conclusion, the assessment of the luteal blood flow by Color Doppler US is more efficient about the CL functionality throughout luteal phases (growth, static and regression) when compared to the luteal biometry by B-mode US. The number of colored pixels is indicated for research regarding to luteal functionality due to their better correlation with P4 values. In addition, the luteal subjective evaluation can be used under field conditions due to a greater convenience and similar pattern of correlation with the P4 and luteal function.

Acknowledgments

Authors thank Embrapa (Project 04.12.09.012.00.00) and FAPERJ for financial support. FZB and JFF are fellows of the CNPq. Authors also thank Arashiro EK and Panzenhagen PHN by the critical review of the manuscript.

Tables

Table 1.

Coefficients of correlation and determination obtained between the luteal biometric (LB) and luteal blood flow (LBF) data with the P4 in different luteal phases in Saanen goats (n=20)

Luteal phase	P4	VCL	DCL	ACL	PIX	INTPIX	SUBJ
Luteogenesis	r	0.72	0.78	0.74	0.71	0.71	0.68
Growth phase (D1-D9)	r ²	0.48	0.57	0.51	0.45	0.45	0.41
Luteogenesis	r	0.17	0.18	0.17	ns	ns	ns
Static phase (D10-D15)	r ²	0.01	0.01	0.01	ns	ns	ns
luteolysis	r	0.69	0.64	0.68	0.80	0.80	0.78
(-48 to +72 h)	r ²	0.46	0.41	0.46	0.61	0.62	0.59
Early	r	0.34	0.37	0.31	0.20	0.15	0.12
pregnancy (D16-D21)	r ²	0.10	0.12	0.07	ns	ns	ns

Initials: P4: progesterone; VCL: luteal volume; DCL: luteal diameter; ACL: luteal area; PIX: number of colored pixel; INTPIX: total pixel intensity CL; SUBJ: subjective evaluation; ns: not significant.

Table 2.

Correlations obtained ($p < 0.01$) between the luteal diameter and number of colored pixels of the greatest, intermediate and smallest CL with P4 values in luteogenesis period (D0-D15) in Saanen goats ($n=20$)

	DCL1	DCL2	DCL3	PIX1	PIX2	PIX3
P4 (r)	0.75	0.75	0.61	0.71	0.74	0.57
P4 (r^2)	0.60	0.60	0.38	0.44	0.56	0.41

Initials: P4: progesterone; DCL1: luteal diameter of the greatest CL; DCL2: luteal diameter of the intermediate CL; DCL3: luteal diameter of the smallest CL; PIX1: number of colored pixels of the greatest CL; PIX2: number of colored pixels of the intermediate CL; PIX3: number of colored pixels of the smallest CL.

Table 3.

Correlations obtained ($p < 0.01$) between the luteal diameter and number of colored pixels of the smallest CL, considering it as an ovulation result or from a luteinized-persistent follicles (FPL), with the P4 values in luteogenesis of Saanen goats ($n=20$)

	P4	
	CL from ovulation (n =3)	LPF (n=3)
DCL3 (r)	0.70	0.36
DCL3 (r^2)	0.41	0.01*
PIX3 (r)	0.71	0.26
PIX3 (r^2)	0.39	0.03*

Initials: P4: progesterone; DCL3: luteal diameter of the smallest CL; PIX3: number of colored pixels of the smallest CL. * $p > 0.05$.

Table 4.

Simple and multiple equations for the P4 estimation from the luteal diameter, number of colored pixel and subjective evaluation of the greatest, intermediate and smallest CL in luteogenesis in Saanen goats (n=20)

Number of CL	Equations to P4 estimation	r ²
1 CL (n = 6)	$P4 = 0.13_{DCL} - 8.1$	0.65
	$P4 = 0.73_{DCL} + 0.75_{PIX} + 0.89_{SUBJ} - 6.0$	0.75
	$P4 = 0.80_{DCL} + 0.11_{PIX} - 4.9$	0.69
	$P4 = 0.75_{DCL} + 0.93_{SUBJ} - 6.3$	0.76
2 CL (n = 10)	$P4 = 0.61_{DCL1} + 0.12_{DCL2} - 1.0$	0.55
	$P4 = 0.38_{DCL1} + 0.95_{DCL2} + 0.45_{SUBJ1} + 0.69_{PIX2} - 0.44_{SUBJ2} - 0.53_{PIX1} - 7.6$	
	$P4 = 0.52_{DCL1} + 0.80_{DCL2} + 0.82_{PIX1} + 0.90_{PIX2} - 7.4$	0.59
	$P4 = 0.42_{DCL1} + 1.0_{DCL2} + 0.61_{SUBJ1} - 0.17_{SUBJ2} - 8.3$	0.53
3 CL (n = 4)	$P4 = 0.12_{DCL1} + 0.83_{DCL2} - 0.40_{DCL3} - 1.3$	0.71
	$P4 = 0.49_{DCL1} + 0.32_{DCL2} + 0.17_{PIX2} + 0.62_{PIX3} + 0.43_{SUBJ2} - 0.77_{DCL3} - 0.22_{PIX1} - 0.17_{SUBJ1} - 0.87_{SUBJ3} - 3.8$	
	$P4 = 0.36_{DCL1} + 0.10_{DCL2} + 0.39_{DCL3} + 0.22_{PIX2} + 0.69_{PIX3} - 0.78_{PIX1} - 1.4$	
	$P4 = 0.86_{DCL1} + 0.85_{DCL2} + 0.71_{SUBJ2} + 0.30_{SUBJ3} - 0.77_{DCL3} - 0.33_{SUBJ1} - 1.2$	0.73

Initials: DCL1: luteal diameter of the greatest CL; DCL2: luteal diameter of the intermediate CL; DCL3: luteal diameter of the smallest CL; SUBJ1: subjective evaluation of the greatest CL; SUBJ2: subjective evaluation of the intermediate CL; SUBJ3: subjective evaluation of the smallest CL; PIX1: number of colored pixels of the greatest CL; PIX2: number of colored pixels of the intermediate CL; PIX3: number of colored pixel of the smallest CL.

Table 5.

Relative proportions (percentages) and number of observations of goats with P4 below and above 1.0 ng/mL for specific categories of subjective evaluation (SUBJ), number of colored pixels (NPIX), luteal diameter (DCL), luteal area (ACL) and luteal volume (VCL) with the average P4 values

Category	P4 < 1.0 ng/mL, % (number of observations)	P4 > 1.0 ng/mL, % (number of observations)	P4 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$;ng/mL)
SUBJ, %			
0 – 15.0	63 (19/30)	37 (11/30)	1.2 ± 0.2
15.1 – 30.0	36 (9/25)	57 (17/30)	3.6 ± 0.9
30.1– 45.0	0 (0/30)	100 (30/30)	7.3 ± 0.9
45.1 – 60.0	0 (0/53)	100 (53/53)	12.1 ± 0.6
60.1– 75.0	0 (0/137)	100 (137/137)	12.6 ± 0.3
75.1 – 90.0	0 (0/70)	100 (70/70)	12.7 ± 0.4
NPIX			
0 – 1119	45 (33/73)	55 (40/73)	1.8 ± 0.2
1200 – 2399	0 (0/49)	100 (49/49)	9.2 ± 0.7
2400 – 3599	0 (0/55)	100 (55/55)	12.0 ± 0.4
3600 – 4799	0 (0/94)	100 (94/94)	13.2 ± 0.4
4800 – 5999	0 (0/66)	100 (66/66)	12.4 ± 0.3
6000 – 7200	0 (0/22)	100 (22/22)	14.5 ± 0.9
DCL, mm			
5.5 – 6.9	63 (12/19)	37 (7/19)	1.0 ± 0.1
7.0 – 8.9	29 (14/48)	71 (34/48)	3.0 ± 0.4
9.0 – 10.9	6 (3/47)	94 (44/47)	6.3 ± 0.6
11.0 – 12.9	3 (3/97)	97 (94/97)	10.2 ± 0.4
13.0 – 14.9	0 (0/131)	100 (131/131)	13.0 ± 0.3
15.0 – 16.9	0 (0/59)	100 (59/59)	13.9 ± 0.4
ACL, mm²			
25.0 – 64.9	36 (24/67)	64 (43/67)	2.6 ± 0.3

65.0 – 104.9	8 (5/61)	92 (56/61)	6.9 ± 0.6
105.0 – 144.9	2 (2/118)	98 (116/118)	10.8 ± 0.4
145.0 – 184.9	0 (0/120)	100 (120/120)	13.9 ± 0.3
185.0 – 224.0	0 (0/31)	100 (31/31)	13.2 ± 0.5
225.0 – 265.0	0 (0/2)	100 (2/2)	13.0 ± 1.2
VCL, cm³			
0.00 – 0.49	31 (27/86)	69 (59/86)	2.9 ± 0.3
0.50 – 0.99	6 (5/89)	94 (84/89)	8.8 ± 0.5
1.00 – 1.49	0 (0/122)	100 (122/122)	11.9 ± 0.3
1.50 – 1.99	0 (0/77)	100 (77/77)	14.5 ± 0.4
2.00 – 2.49	0 (0/23)	100 (23/23)	13.4 ± 0.6
2.50 – 2.75	0 (0/4)	100 (4/4)	12.8 ± 0.6

*n, Total number of CL in it subgroup.

Figures and legends

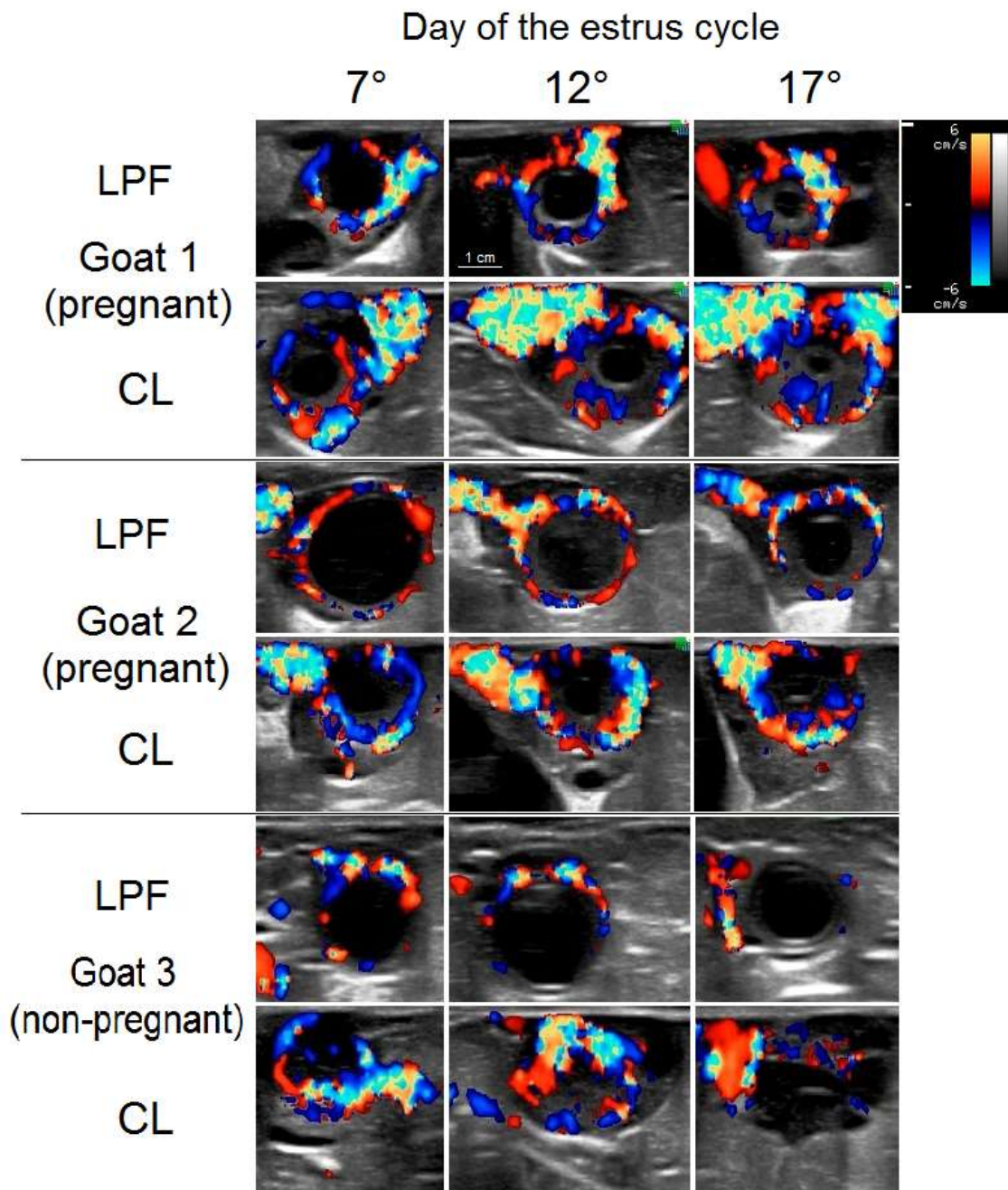


Figure 1. Color Doppler images from ovaries containing *corpora lutea* and luteinized-persistent follicles (LPF) throughout the 7th, 12th and 17th day of the estrus cycle in three Saanen goats.

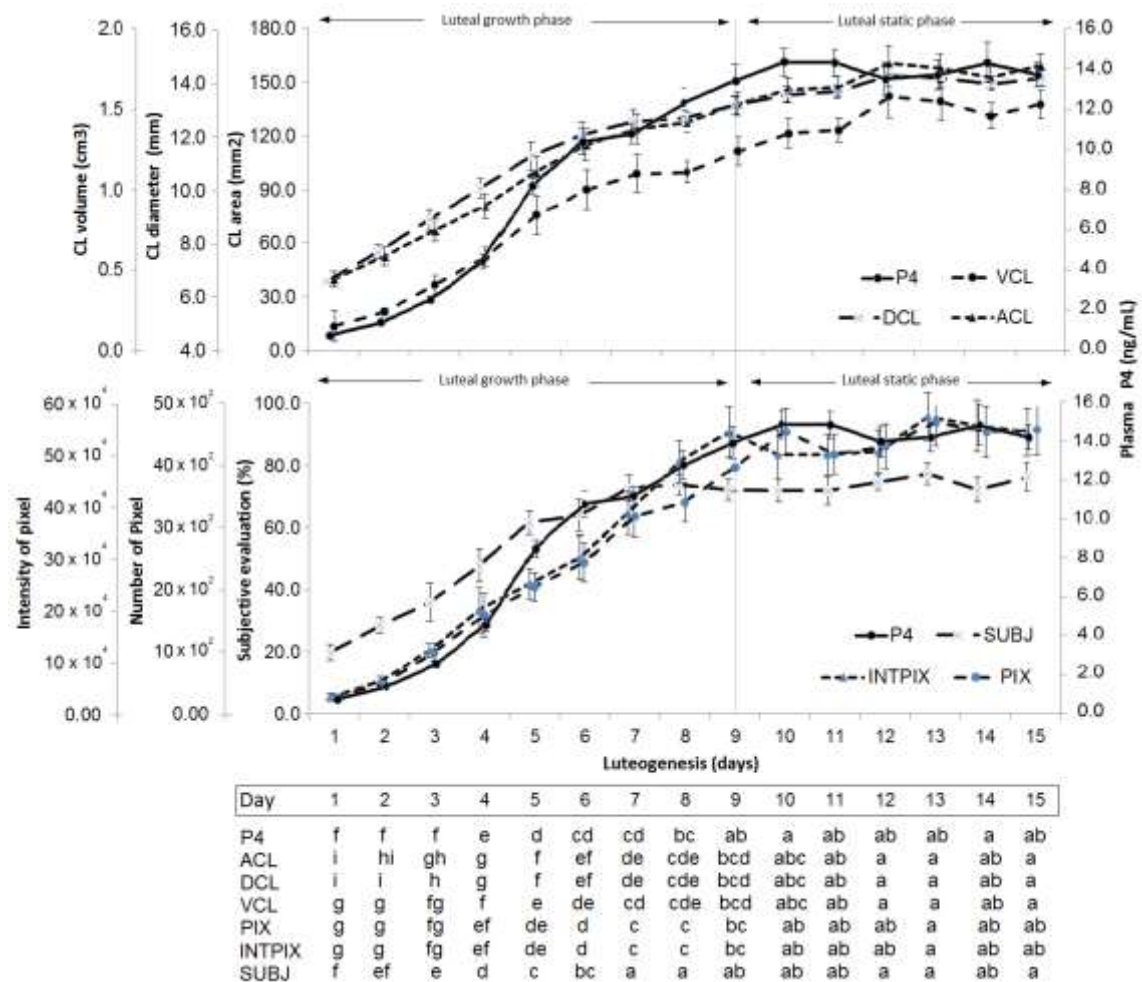
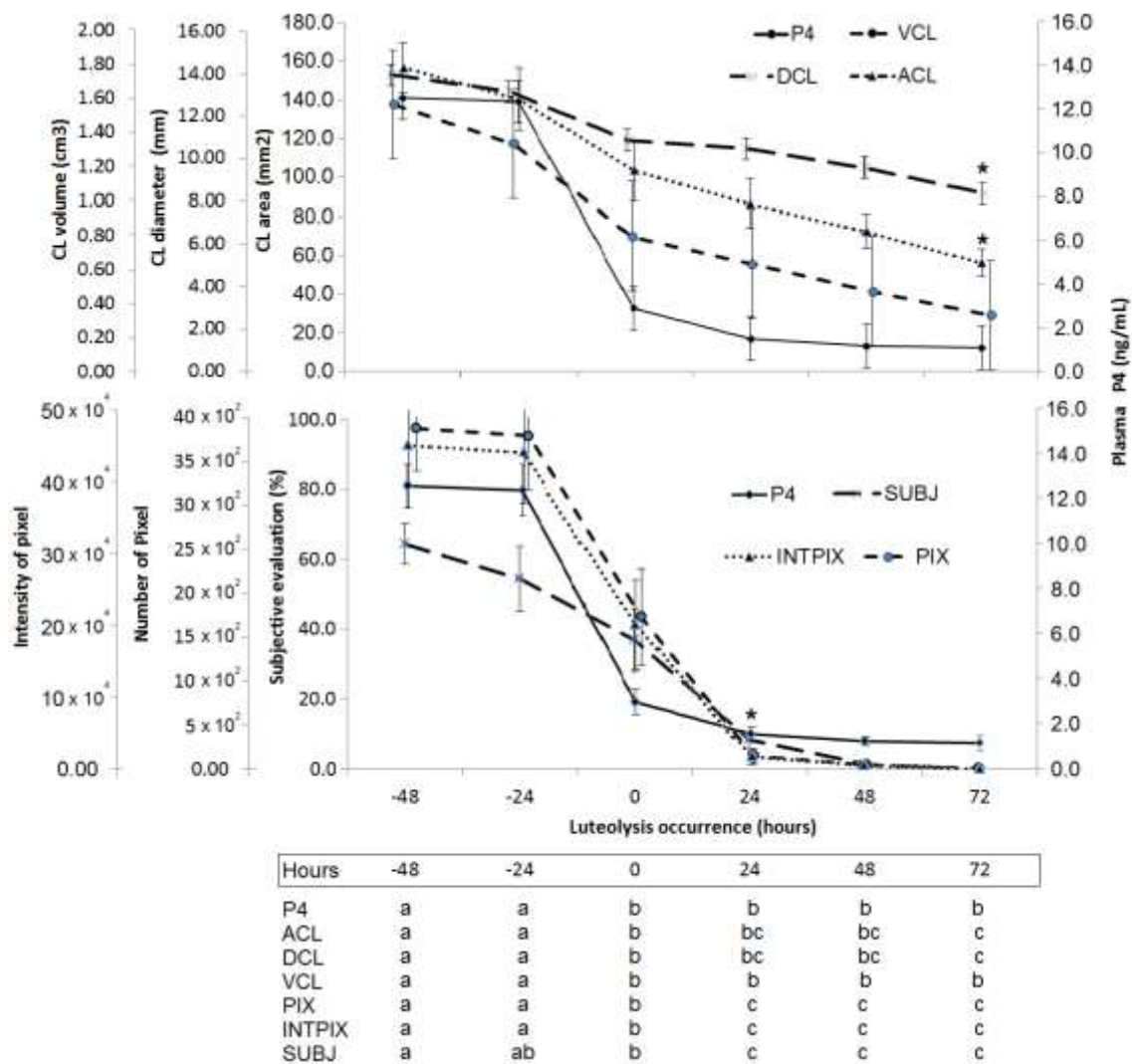


Figure 2. Luteal volume (VCL), luteal diameter (DCL), luteal areal (ACL), number of colored pixel (PIX), total pixel intensity (INTPIX), and subjective evaluation (SUBJ) from the greatest CL along the plasma concentration of progesterone (P4) in the luteogenesis in Saanen goats (n=20).



* Indicates a difference ($p < 0.05$) from the moment 0 (beginning of luteolysis).

Figure 3. Luteal volume (VCL), luteal diameter (DCL), luteal area (ACL), number of colored pixel (PIX), total pixel intensity (INTPIX) and subjective evaluation (SUBJ) from the greatest CL along the plasma concentration of progesterone (P4). Data were organized in the luteolysis in non-pregnant Saanen goats (n=11).

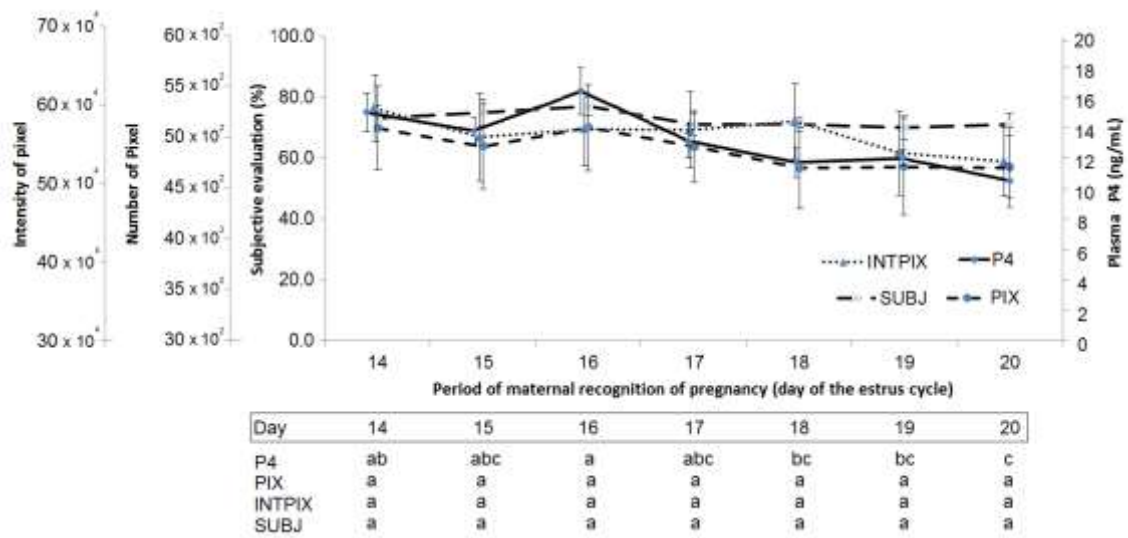


Figure 4. Number of colored pixel (PIX), total pixel intensity (INTPIX) and subjective evaluation (SUBJ) along the plasma concentration of progesterone (P4) in the maternal recognition of pregnancy (early pregnancy) in Saanen goats (n=9).

5. References

- [1] Miyamoto A, Shirasuna K, Hayashi KG, Kamada D, Awashima C, Kaneko E, Acosta TJ, Matsui M. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: new observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. *J Reprod Dev* 2006;52:153–60.
- [2] De Castro T, Rubianes E, Menchaca A, Rivero A. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology* 1999;52:399–411.
- [3] Medan MS, Watanabe G, Sasaki K, Sharawy S, Groome NP, Taya K. Ovarian dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins, ovarian steroids, and inhibin during the estrous cycle in goats. *Biol Reprod* 2003;69:57–63.
- [4] Simões J, Potes J, Azevedo J, Almeida JC, Fontes P, Baril G, Mascarenhas R. Morphometry of ovarian structures by transrectal ultrasonography in Serrana goats. *Anim Reprod Sci* 2005;85:263-73.
- [5] Simões J, Almeida JC, Baril G, Azevedo J, Fontes P, Mascarenhas R. Assessment of luteal function by ultrasonographic appearance and measurement of corpora lutea in goats. *Anim Reprod Sci* 2007;97:36–46.
- [6] Minton JE, Coppinger TR, Spaeth CW, Martin LC. Poor reproductive response of anestrus Suffolk ewes to ram exposure is not due to failure to secrete luteinizing hormone acutely. *J ANIM SCI* 1991;69:3314–20.
- [7] Bicalho RC, Galvão KN, Guard CL, Santos JE. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. *Theriogenology* 2008;70:199–207.
- [8] Arashiro EKN, Viana JHM, Fonseca JF, Camargo LSA, Fernandes CAC, Brandão FZ. Luteal dynamics in goats: morphological and endocrine features. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2010;39:1937-42.
- [9] Kaessmeyer S, Plendl J. Angiogenesis and vasculogenesis in the corpus luteum in vitro. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009;41:83–101.
- [10] Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab* 2010;1:7-47.

- [11] Nishimura R, Okuda K. Multiple roles of hypoxia in ovarian function: roles of hypoxia-inducible factor-related and—unrelated signals during the luteal phase. *Reprod Fertil Dev* 2015;5.
- [12] Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Utt MD, Beg MA. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Anim Reprod Sci* 2007;99:213–20.
- [13] Herzog K, Brockhan-luëdemann M, Kaske M, Beindorff N, Paul V, Niemann H, Bollwein H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology* 2010;73:691–97.
- [14] Herzog K, Voss C, Kastelic JP, Beindorff N, Paul V, Niemann H, Bollwein H. Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2011;75:549–54.
- [15] Figueira LM, Fonseca JF, Arashiro EKN, Souza-Fabjan JMG, Ribeiro ACS, Oba E, Viana JHM, Brandão FZ. Colour Doppler Ultrasonography as a Tool to Assess Luteal Function in Santa Inês Ewes. *Reprod Domest Anim* 2015;50:643-50.
- [16] Siqueira LGB, Areas VS, Ghetti AM, Fonseca JF, Palhao MP, Fernandes CAC, Viana JHM. Color Doppler flow imaging for the early detection of non-pregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2013;96:6461–72.
- [17] Tarso SGS, Apgar GA, Gastal MO, Gastal ELI. Relationships between follicle and corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in beef cows and heifers: preliminary results. *Anim Reprod* 2016;13:81-92.
- [18] Bollwein H, , Mayer R, Weber F, Stolla R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 2002;57:2043–51.
- [19] Utt MD, Johnson GL, Beal WE. The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. *Theriogenology* 2009;71:707–15.
- [20] Esteves LV, Brandão, FZ, Cruz RC, Souza JMG, Oba E, Facó O, Fonseca JF. Reproductive parameters of dairy goats submitted to estrus synchronization with prostaglandin F2 α associated or not to hCG at estrous onset. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2013; 65: 1585-92.
- [21] Ginther OJ, Utt MD. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. *J. Equine Vet. Sci* 2004;24:516-26.
- [22] Ginther OJ. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Book 4, Color-Doppler ultrasonography. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 2007.
- [23] Pugliesi G, Miagawa BT, Paiva YN, França MR, Silva LA, Binelli M. Conceptus-induced changes in the gene expression of blood immune cells and the ultrasound-

accessed luteal function in beef cattle: how early can we detect pregnancy? *Biol Reprod* 2014;91:95.

[24] Greyling JP. Reproduction traits in the Boer goat doe. *Small Rumin Res* 2000;36:171–77.

[25] Lassoued N, Rekik M. Variations saisonnières de l'oestrus et de l'ovulation chez la chèvre locale Maure en Tunisie. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 2005;58:69–73.

[26] Moaeen-ud-din M, Yand LG, Chen SL, Zhang ZR, Xiao JZ, Wen QY, Dai M. Reproductive performance of Matou goat under subtropical monsoonal climate of Central China. *Trop Anim Health Pro* 2008;40:17–23.

[27] Souza JMG, Couto JF, Bruschi JH, Viana JHM, Camargo LSA, Fonseca JF. Estro e ovulação em cabras Saanen em anestro estacional submetidas a protocolos curtos de indução de estro. *Acta Sci Vet* 2007;35.

[28] Rubianes E, De Castro T, Carbajal B. Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave I in ultrasonically monitored ewes. *Can J Anim Sci* 1996;76:473-75.

[29] Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Chandolia RK, Honaramooz A, Rawlings NC. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J Reprod Infertil* 1999;115:111–24.

[30] Baby TE, Bartlewski PM. Progesterone as the driving regulatory force behind serum FSH concentrations and antral follicular growth in cyclic ewes. *Reprod Fertil Dev* 2011;23:303–10.

[31] Duggavathi R, Bartlewski PM, Barrett DMW, Rawlings NC. The temporal relationship between the pattern of LH and FSH secretion, and development of ovulatory-sized follicles during the mid- to late luteal phase of sheep. *Theriogenology* 2005;64:393– 407.

[32] Barrett DMW, Duggavathi R, Davies KL, Bartlewski PM, Bagu ET, Rawlings NC. Differential effects of various estradiol-17beta treatments on follicle-stimulating hormone peaks, luteinizing hormone pulses, basal gonadotropin concentrations, and antral follicle and luteal development in cyclic ewes. *Biol Reprod* 2007;77:252–62.

[33] Jiang Yi-Fan, Hsu Meng-Chieh, Cheng Chiung-Hsiang, Tsui Kuan-Hao, Chiu Chih-Hsien. Ultrastructural changes of goat corpus luteum during the estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 2016;170:38–50.

- [34] Fonseca JF, Esteves LV, Zambrini FN, Brandão FZ, Peixoto MGCD, Verneque RS, Siqueira LGB, Viana JHM. Viable offspring after successful non-surgical embryo transfer in goats. *Arq Bras Med Vet Zoo* 2014;66:613-16.
- [35] Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:464–78.
- [36] Armulik A, Genove G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* 2011;21:193–215.
- [37] Lei ZM, Chegini N, Rao CV. Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. *Biol Reprod* 1991;44:1148–56.
- [38] Shirasuna K, Wijayagunawardane MPB, Watanabe S, Yamamoto D, Matsui M, Ohtani M. A blood flow in the corpus luteum acutely increases together with endothelin-1 mRNA expression at early stage of regression during spontaneous luteolysis in the cow. *Biol Reprod* 2004;71:137.
- [39] Miyamoto A, Shirasuna K, Wijayagunawardane Mp, Watanabe S, Hayashi M, Yamamoto D. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domest Anim Endocrin* 2005;29:329-39.
- [40] Shirasuna K, Nitta A, Sineenard J, Shimizu T, Bollwein H, Miyamoto A. Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow. *Domest Anim Endocrinol* 2012;43:198–211.
- [41] Miyamoto, A.; Shirasuna, K.; Shimizu, T. Impact of angiogenic and innate immune systems on the corpus luteum function during its formation and maintenance in ruminants. *Biol Reprod* 2013;13:272–78.
- [42] Peter AT, Levine H, Drost M, Bergfelt DR. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology* 2009;71:1343–57.

7. CAPÍTULO 3

Reproductive seasonality in Saanen goats under tropical conditions

Estacionalidade reprodutiva em cabras leiteiras em condições tropicais

Artigo a ser submetido no periódico: Animal Reproduction Science

Em: Dezembro de 2016

Qualis: A2 – Medicina Veterinária

Estacionalidade reprodutiva em cabras leiteiras em condições tropicais

Mario Felipe A. Balaro^{a*}; Samuel Guaraná Valverde de Mello^a; Luiza Mattos Cavalcanti^a; Nádia Pereira Regina Almosny^a; Jeferson F. Fonseca^b; Felipe Z. Brandão^a

^a *Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, RJ, Brasil.*

^b *Embrapa Caprinos e Ovinos, Rodovia MG 133, km 42, CEP 36155-000, Coronel Pacheco, MG, Brasil.*

Endereço do autor (para correspondência): MFA Balaro, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 24230-340, Brasil.

Email: mariobalaro@hotmail.com

Resumo

O objetivo deste estudo foi acompanhar a estacionalidade reprodutiva em cabras da raça Saanen de diferentes ordens de parto (nulípara, primípara e plurípara) durante o período de um ano na região Sudeste, Rio de Janeiro, Brasil. Em adição, foi verificado a influência de índices ambientais, desempenho ponderal, perfil metabólico e produção leiteira sobre a estacionalidade reprodutiva nesta raça. Foram utilizadas 40 cabras da raça Saanen mantidas em sistema intensivo a Latitude 22° 52' 30" sul e fotoperíodo tropical (11-13 horas de luz por dia). Quinzenalmente, o sangue de cada animal foi colhido para avaliação das concentrações séricas de progesterona e identificação do estado cíclico. Mensalmente, foram coletados dados ambientais (índice pluviométrico, temperatura máxima, temperatura mínima e comprimento da luminosidade local) e sangue para avaliação do perfil metabólico. A cada dois meses foram efetuados a pesagem, avaliação do ECC e produção de leite dos animais experimentais. Não houve diferença no peso corporal e ECC nas cabras paridas, mas as cabras nulíparas apresentaram ganho de peso ao longo do período experimental. As cabras nulíparas apresentaram a estação reprodutiva no período do inverno enquanto que as cabras primíparas e pluríparas mantiveram-se cíclicas no outono e inverno. Independente da ordem de parto, todos os animais apresentaram anestro estacional marcado na primavera. Interações sociais, a partir de Dezembro, foram capazes de restabelecer, em graus distintos, o estado cíclico nas cabras. Igualmente, índices ambientais e ponderais/metabólicos possuíram baixa e moderada influência, respectivamente, sobre a estacionalidade reprodutiva nos animais avaliados.

Palavras-chave: comportamento sexual, interações sociais, perfil metabólico, peso vivo, progesterona.

1. Introdução

No Brasil, a caprinocultura leiteira vem se consolidando nas últimas décadas e é uma alternativa favorável à geração de emprego e renda no campo, principalmente por meio dos programas de fomento da agricultura familiar (HOLANDA JÚNIOR et al., 2008). A região Sudeste, de acordo com Borges (2003), apesar de dispor de apenas 3,5% do efetivo caprino do Brasil, a região destaca-se pela produção comercial (~21% do total produzido no país) e pela representatividade de seus Estados no agronegócio caprino leiteiro. Nesses sistemas, são explorados animais de raças leiteiras especializadas, como a Saanen. Entretanto, salienta-se que há diversos fatores que vem impossibilitando a elevação da produtividade e da oferta de leite ou de carne caprina no Brasil como a estacionalidade reprodutiva e, por conseguinte, da produção (GONÇALVES et al., 2008). Esta realidade enfraquece a cadeia produtiva e torna inconstante a receita obtida a partir da produção de tal espécie (CHEMINEAU et al., 2007).

Hormônios exógenos (progestágenos, eCG, prostaglandinas, melatonina, etc.) têm sido frequentemente utilizados para evitar a estacionalidade e induzir a atividade reprodutiva durante o descanso sexual (FATET, PELLICER-RUBIO e LEBOEUF, 2011). Entretanto, nos últimos anos, diversos países na União Europeia têm adotado restrições ao uso de hormônios sintéticos na pecuária devido à demanda dos consumidores por métodos naturais, considerados verdes, limpos e éticos (MARTIN e KADOKAW, 2006). Deste modo, visando à redução do uso de tratamentos hormonais, é necessário o conhecimento do ritmo reprodutivo anual de raças caprinas europeias manejadas em condições tropicais. Outrossim, quando a luminosidade apresenta baixa variação, como ocorre em latitudes tropicais e subtropicais, outros eventos ambientais podem ser adotados como complemento para depurar o ritmo reprodutivo (CHEMINEAU et al., 2004), tais quais: a nutrição (DUARTE et al., 2008; ESTRADA-CORTÉS et al., 2009; DE SANTIAGO-MIRAMONTES et al., 2009; GALLEGU-CALVO et al., 2014), fatores sócio sexuais como o efeito macho e fêmea (SCARAMUZZI e MARTIN et al., 2008; ABECIA et al., 2015; DELGADILLO et al., 2015; PONCE et al., 2015; ORIHUELA et al., 2016) e os aspectos climáticos como chuvas (SILVA et

al., 1998; MORALES et al., 2016) que parecem ser componentes importantes na plasticidade cerebral. O efeito associativo desses fatores poderiam explicar a grande variabilidade encontrada ao tentar caracterizar o padrão estacional da atividade reprodutiva em cabras sob condições tropicais e subtropicais

O presente estudo buscou caracterizar a estacionalidade reprodutiva em cabras da raça Saanen de diferentes ordens de parto (nulípara, primípara e plurípara) durante o período de um ano na região Sudeste, Rio de Janeiro, Brasil. Em adição, pretende-se verificar a influência de alguns índices meteorológicos, desempenho ponderal, perfil metabólico e produção leiteira sobre a estacionalidade reprodutiva na raça.

2. Material e métodos

2.1 Localização, animais experimentais e interações sociais

Este estudo foi desenvolvido durante março de 2015 à março de 2016 no Capril Água da Pedra situado no município de Niterói, Rio de Janeiro. Localizado a Latitude 22° 52' 30" sul e longitude 43° 02' 15" oeste, a uma altitude média de 30m, ao nível do mar. Segundo classificação de Köppen, o clima é do tipo tropical semi-úmido (Aw).

Foram utilizadas 40 cabras da raça Saanen. Destas, 12 cabras nulíparas púberes ($0,8 \pm 0,2$ anos; $26,1 \pm 5,4$ kg; $3,0 \pm 0,2$ ECC), 14 cabras primíparas ($2,9 \pm 0,3$ anos; $69,6 \pm 11,2$ kg; $3,3 \pm 0,2$ ECC) e 14 cabras pluríparas ($5,4 \pm 1,1$ anos; $79,5 \pm 10,7$ kg; $3,5 \pm 0,3$ ECC). Os animais eram mantidos em sistema intensivo. Após a ordenha da manhã, as cabras adultas recebiam ração de produção formulada na propriedade com 22-24% de proteína bruta e as cabritas recebiam ração de crescimento com 18% de proteína bruta. Na sequência, de 10 às 14 h, os animais eram levados para a área de solário onde era ofertado cerca de 4 kg de MV/por animal de capim elefante inteiro e 3 kg/por animal de resíduo úmido de cervejaria. Após a ordenha da tarde, às 16 h, os animais recebiam ração comercial novamente, totalizando 0,8 à 1,3 kg por cabra em produção/dia e 0,4 à 0,6 kg por cabrita/dia. Os animais recebiam água e sal mineral (Salminas Caprinos[®], Salminas, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil) à vontade.

Com relação às interações sociais, as cabras primíparas e pluríparas foram mantidas em três baias distintas de acordo com a sua produção de leite (baia 1: < 1,5 L/dia; baia 2: 1,5 – 3,5 L/dia; baia 3: > 3,5 L/dia). Já as cabras nulíparas foram mantidas juntas na mesma baia durante todo o período experimental. Todas as cabras, independente da ordem de parto estudada, possuíam acesso visual, olfativo e sonoro as outras no galpão, além da interação tátil quando estavam no solário entre as ordenhas. A estação reprodutiva ocorreu em dois períodos na propriedade: (1) entre 18 de março e 30 de maio em que as cabras experimentais foram submetidas ao efeito fêmea de cabras não experimentais (em estro natural ou sincronizadas com prostaglandinas) e ao efeito macho (visual, olfativo e sonoro) quando o bode era levado ocasionalmente até uma área comum do galpão para cobertura de tais cabras não experimentais em estro; (2) entre os dias 11-12 e 18-19 de dezembro, quando as cabras nulíparas experimentais foram expostas ao efeito fêmea de cabras da mesma baia que foram induzidas e sincronizadas para cobertura com o bode. Para minimizar a influência do efeito macho sobre o experimento, nesta época, as cabras foram levadas até as baias dos bodes para a cobertura. Deste modo, os bodes não tiveram acesso ao galpão ou solário onde era mantido o plantel.

2.2 índices meteorológicos

Diariamente, foram coletados dados relativos ao índice pluviométrico, temperatura máxima, temperatura mínima e comprimento da luminosidade local (Pendotiba, Niterói, Brasil) a partir dos respectivos websites: <<http://www.climatempo.com.br/>> e <<https://www.timeanddate.com/>>. Foi utilizada a média mensal dos índices climáticos para a descrição das condições ambientais.

2.3 Desempenho ponderal e produção de leite

Nos meses de março/15, maio/15, julho/15, setembro/15, dezembro/15 e março/16 foram efetuados a pesagem dos animais e avaliado o escore de condição corporal (ECC) conforme Detweiler et al. (2008). Os dados da

produção leiteira de cabras primíparas e pluríparas foram coletados nos mesmos meses a partir de dados do controle leiteiro oficial na propriedade.

2.4 Avaliações ultrassonográficas

A cada 45 dias, foram realizadas avaliações ultrassonográficas em todas as cabras utilizando um aparelho portátil de ultrassom (CTS-800[®], Shantou Institute of Ultrasonic Instruments Co. Ltd. SIUI, Guangdong, China) acoplado a um transdutor linear de 7,5 MHz (via transretal) a fim de avaliar a saúde do trato genital.

2.5 Avaliações bioquímicas, hormonais, estado cíclico e comportamento sexual

A cada 15 dias para mensuração hormonal e 30 dias para avaliação bioquímica, o sangue de cada animal foi colhido pela venopunção jugular em tubo a vácuo (Vacutainer[®], BD, Juiz de Fora, MG, Brasil) sem anticoagulante, para obtenção do soro. Após a colheita, as amostras foram centrifugadas (2600 X g), identificadas e acondicionadas em microtubos e armazenadas em congelador a -20 °C. As análises bioquímicas para glicose, triglicerídeos, colesterol, proteínas totais, ureia e albumina foram realizadas por meio da técnica de espectrofotometria utilizando kits comerciais (Labtest[®], Labtest Diagnóstica AS, Minas Gerais, Brasil) em um analisador bioquímico automático (LabMax 240 premium[®], Labtest Diagnóstica AS, Minas Gerais, Brasil) no Laboratório de Pesquisa Clínica e Molecular Marcilio Dias do Nascimento da Faculdade de Veterinária da UFF. Os valores bioquímicos obtidos foram interpretados de acordo com referências propostas por Mundim et al. (2007). As dosagens de P4 séricas foram realizadas no Laboratório de Dosagem Hormonal da Faculdade de Veterinária da UFF por meio da técnica de Radioimunoensaio de fase sólida utilizando kits comerciais (ImmuChem, MP Biomedicals, Santa Ana, California, USA). A sensibilidade e coeficiente intraensaio foram 0,05 ng/mL e 12%, respectivamente. Todos os dados situaram-se dentro do ponto máximo e mínimo da curva.

A ciclicidade das cabras foi interpretada de acordo com Minton et al. (1991) em que duas avaliações seguidas com progesterona sérica > 1,0 ng/mL

indicavam a presença de um CL funcional e o estado cíclico ativo do animal. A detecção de cabras no rebanho apresentando comportamento sexual (estro) era feita diariamente pelo funcionário, previamente treinado, na hora do arração pela tarde e os dados foram organizados e classificados como presença de animais em estro ou não (sim/não) por mês de estudo.

2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados no programa Sistema para Análises Estatísticas (SAEG[®] 9.0, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil). Inicialmente, adotou-se o teste de Lilliefors para se avaliar a normalidade das variáveis. As variáveis quantitativas normais (paramétricas) foram submetidas à análise de variância - ANOVA para medidas repetidas no tempo e comparação de médias pelo teste de Tukey. As variáveis quantitativas não normais (não paramétricas) foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis e comparação de médias pelo teste de Dunn. O teste exato de Fisher foi adotado para comparar os dados de frequência relativos ao estado cíclico dos animais. O índice de correlação de Pearson foi utilizado para verificar as correlações entre a P4 sérica e as outras variáveis ambientais, metabólicas e ponderais estudadas por ordem de parto das cabras. Para todos os testes, $p < 0,05$ foi considerado como significativo.

3. Resultados

3.1 Índices meteorológicos

Os dados relativos ao índice pluviométrico e temperaturas máximas e mínimas nas estações diferentes do ano encontram-se na Figura 1.

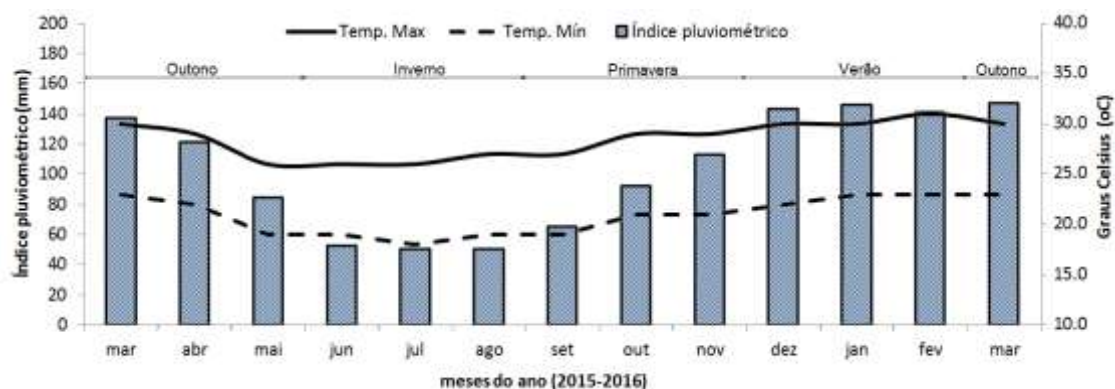


Figura 1. Índice pluviométrico (mm) e temperaturas máxima e mínima (°C) ao longo das estações do ano.

A diferença de fotoperíodo ao longo do estudo foi exposta na figura 2. No solstício do inverno (21/06/2015), detectou-se 10:42 h de luminosidade e 13:16 h de escuridão com diferença total de 2:36 h a mais de escuridão. Já no solstício do verão (21/12/2015) foram 13:30 h de luminosidade e 10:30 h de escuridão com diferença total de 3:00 h a mais de luminosidade.

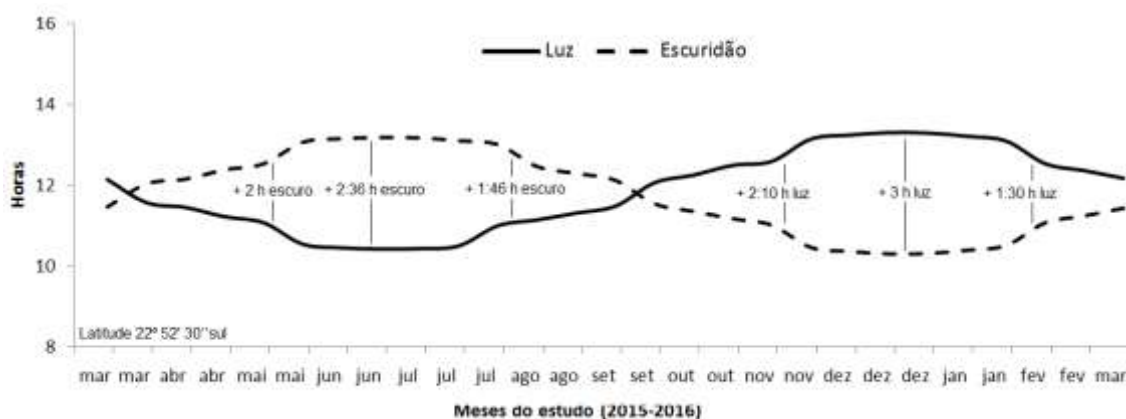
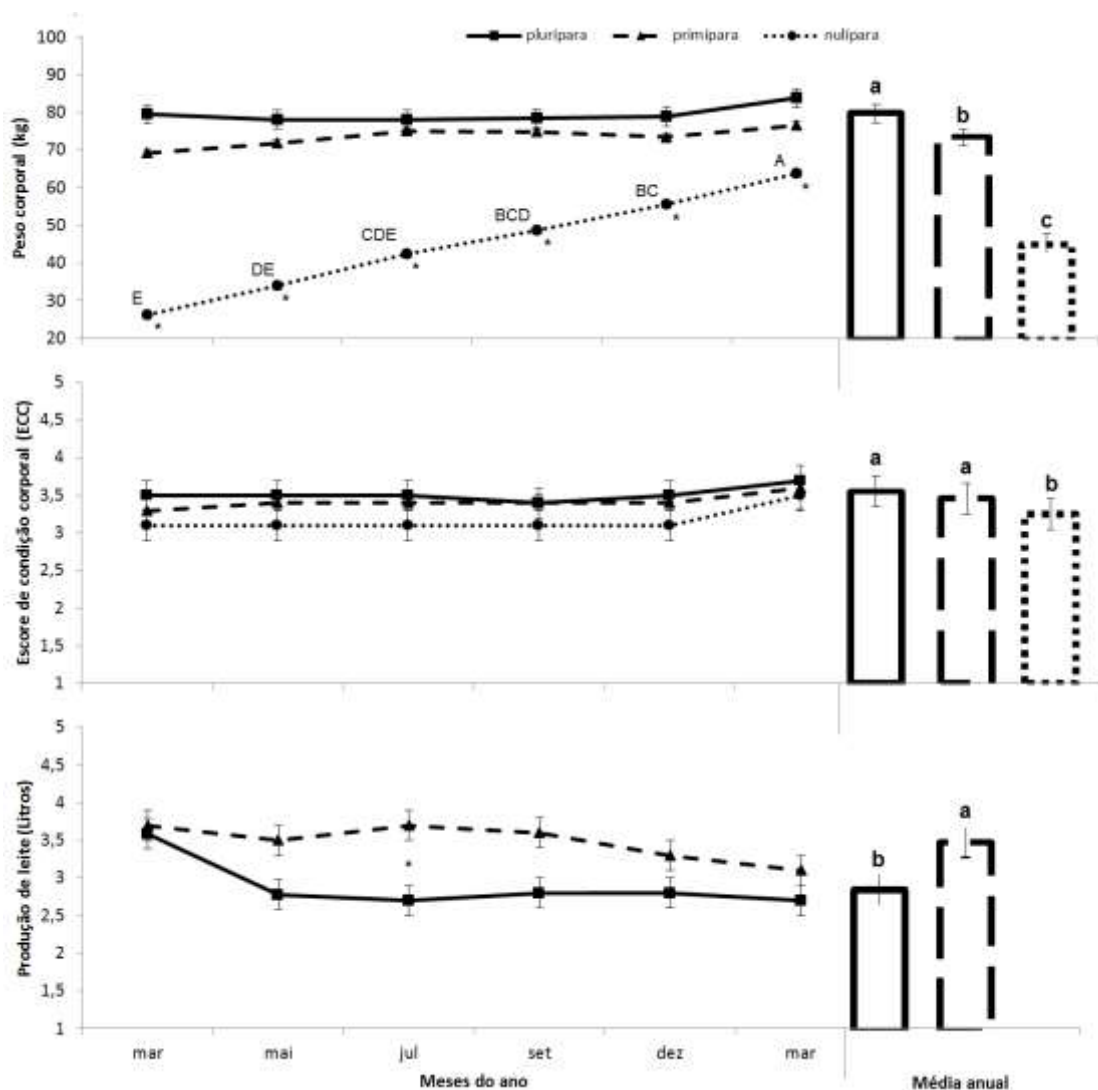


Figura 2. Comprimento da luz do dia e escuridão (horas) ao longo dos meses do ano (2015-2016) experimental.

3.2 Desempenho ponderal e produção de leite

Os dados relativos ao desempenho ponderal e produção de leite, por ordem de parto estudada, estão apresentados na figura 3. Com relação ao peso corporal, verificou-se efeito da ordem de parto na média geral do estudo

($79,4 \pm 10,1$ vs $73,4 \pm 10,5$ vs $45,2 \pm 6,7$ kg; pluríparas, primíparas e nulíparas, respectivamente; $p < 0,05$). Não houve diferença no peso corporal nas categorias das pluríparas e das primíparas ao longo do estudo, mas ambas foram superiores às nulíparas, em todos os tempos. As cabras nulíparas apresentaram ganho de peso significativo ao longo do período experimental. Com relação ao ECC, apenas foi verificado efeito da ordem de parto na média geral do estudo em que as cabras pluríparas e primíparas apresentaram média superior às nulíparas ($3,5 \pm 0,3$ = $3,4 \pm 0,3$ vs $3,2 \pm 0,2$ ECC; $p < 0,05$). Já na produção de leite, verificou-se que as cabras primíparas apresentaram maior produção leiteira média quando comparado as pluríparas no período experimental ($3,5 \pm 0,9$ vs $2,9 \pm 1,0$ L; $p < 0,05$). No mês de julho, a produção leiteira das primíparas também foi superior as pluríparas ($3,7 \pm 0,8$ vs $2,5 \pm 1,3$ L; $p < 0,05$).



A, B, C, D, E Distintos no tempo, dentro da mesma ordem de parto, indicam diferença significativa pelo teste de tukey ($p < 0,05$).

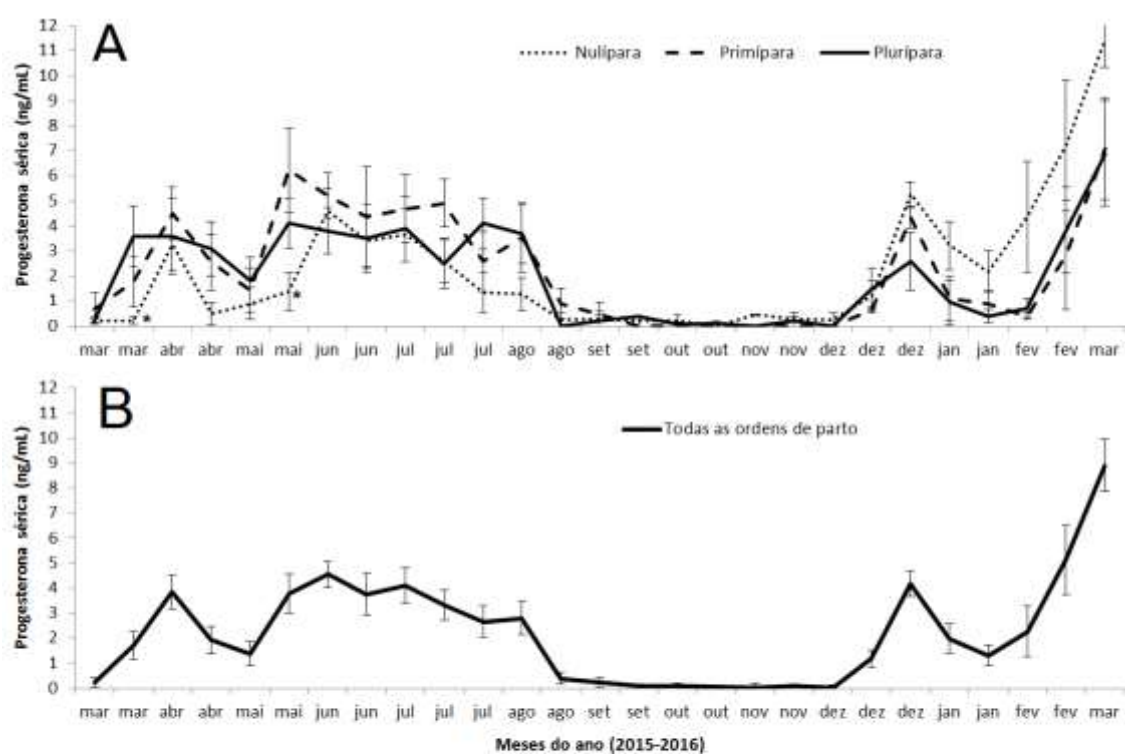
a, b, c ou * Distintos entre ordens de grupos, no mesmo tempo, indicam diferença significativa pelo teste de tukey ($p < 0,05$)

Figura 3. Peso corporal, escore de condição corporal (ECC) e produção leiteira (média $\pm$ EP) de cabras pluríparas, primíparas e nulíparas da raça Saanen ao longo dos meses experimentais junto à média anual.

3.3 Avaliações bioquímicas, hormonais, estado cíclico e comportamento sexual

Verificou-se o efeito de tempo sobre a concentração de P4 sérica sobre todas as ordens de parto (Figura 4). As cabras pluríparas e as primíparas apresentaram maior P4 sérica ($p < 0,05$) que as cabras nulíparas na segunda quinzena de março e maio (* na figura 4). O perfil de P4 sérica foi semelhante em todas as ordens de parto, com certas singularidades ao longo do ano. A partir do início do estudo, em Março, as cabras nulíparas apresentaram

elevação da P4 mais gradual com pico dos valores entre junho e julho e entrada no anestro estacional a partir do final de julho até meio de Dezembro com retorno da atividade cíclica. Já as cabras primíparas e as pluríparas apresentaram rápida elevação na concentração de P4 a partir da segunda quinzena de Março, mantendo os valores estáveis até a primeira quinzena de Agosto com entrada no anestro estacional até o meio de Dezembro, ocasião em que houve novamente uma elevação nas concentrações de P4.

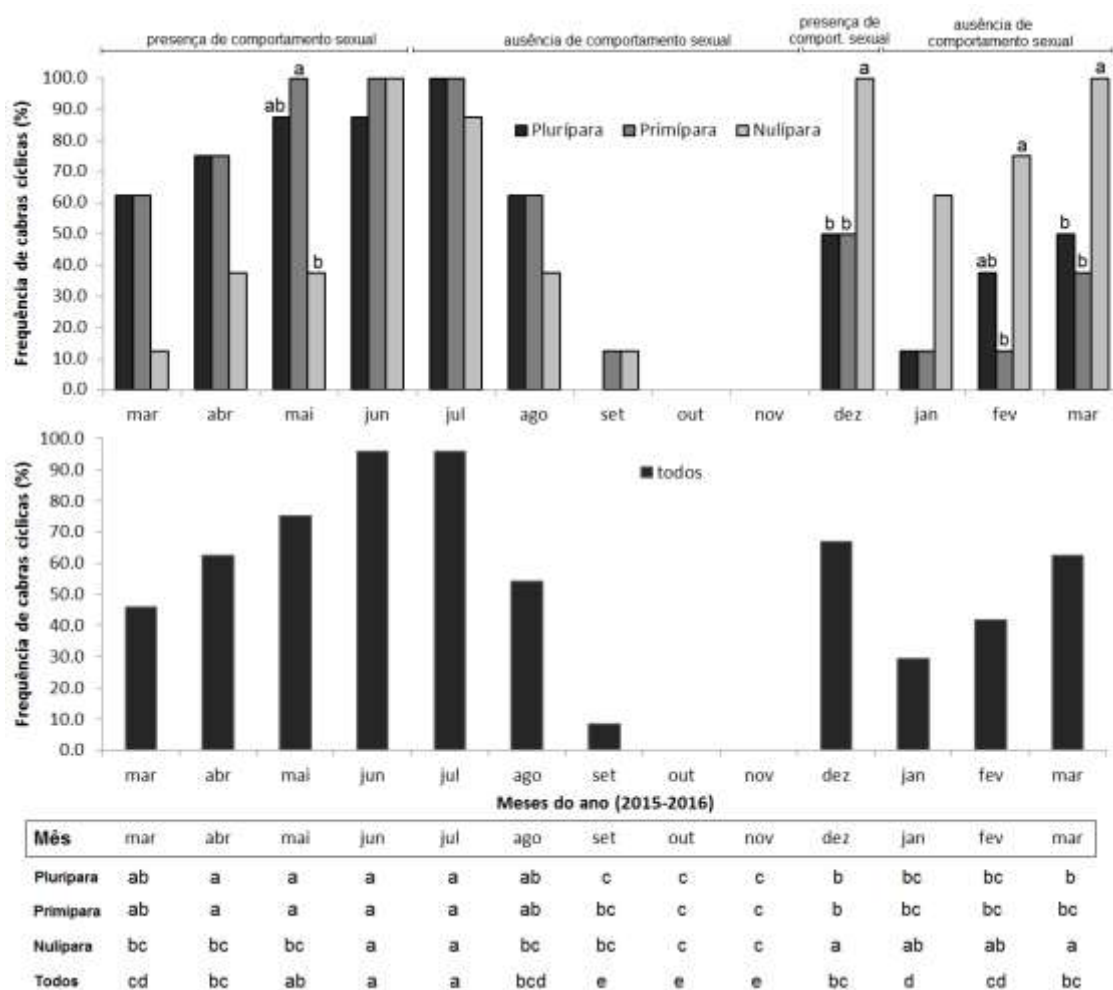


Mes	mar	mar	abr	abr	mai	mai	jun	jun	jul	jul	jul	ago	ago	set	set	out	out	nov	nov	dez	dez	dez	jan	jan	fev	fev	mar
Nulípara	d	d	b	d	cd	cd	ab	bc	bc	bc	cd	cd	d	d	d	d	d	d	d	d	cd	b	b	bc	b	ab	a
Primípara	bc	ab	a	ab	bc	a	a	a	a	a	ab	ab	bc	c	c	c	c	c	c	c	bc	a	bc	bc	c	ab	a
Plurípara	c	a	a	a	ab	a	a	ab	a	ab	a	a	c	c	c	c	c	c	c	c	ab	ab	bc	c	bc	a	a
Todos	c	bc	ab	bc	bc	ab	ab	ab	ab	b	b	c	c	c	c	c	c	c	c	c	bc	ab	bc	bc	ab	ab	a

*Indica diferença ($p < 0,05$) na P4 sérica das cabras nulíparas comparado as pluríparas e primíparas.

Figura 4. Progesterona (P4) sérica em todos os meses do estudo (2015-2016) de cabras da raça Saanen ($n=24$) por: (A) ordem de parto (pluríparas, primíparas e nulíparas) e (B) todas juntas.

Houve efeito de tempo sobre a ciclicidade de todas as ordens de parto estudadas (Figura 5). As cabras pluríparas e as primíparas apresentaram um padrão similar de ciclicidade com a maior parte ou totalidade das cabras ciclando entre Março e Agosto, anestro estacional entre Setembro e Novembro e retorno gradual ao estado cíclico a partir de Dezembro. Já as cabras nulíparas apresentaram maior proporção de animais cíclicos nos meses de Junho e Julho, com início do anestro estacional em Agosto e retorno total (100% dos animais) da atividade luteal em Dezembro com manutenção até Março. Com relação ao comportamento sexual no rebanho, foram verificadas cabras apresentando estro durante os meses de Março até Junho e pontualmente no mês de Dezembro.



^{a,b} Indica diferença entre colunas, no mesmo tempo, pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

Figura 5. Frequência de ciclicidade (%) junto a presença ou ausência de comportamento sexual no rebanho durante os meses do estudo (2015-2016)

em cabras pluríparas, primíparas e nulíparas da raça Saanen.

Verificou-se que todos metabólitos das cabras da raça Saanen apresentaram efeito de tempo ao longo do estudo (Figura 6). Também foi verificada interação de tempo x ordem de parto na glicose, ureia e triglicérides séricos ($p < 0,05$).

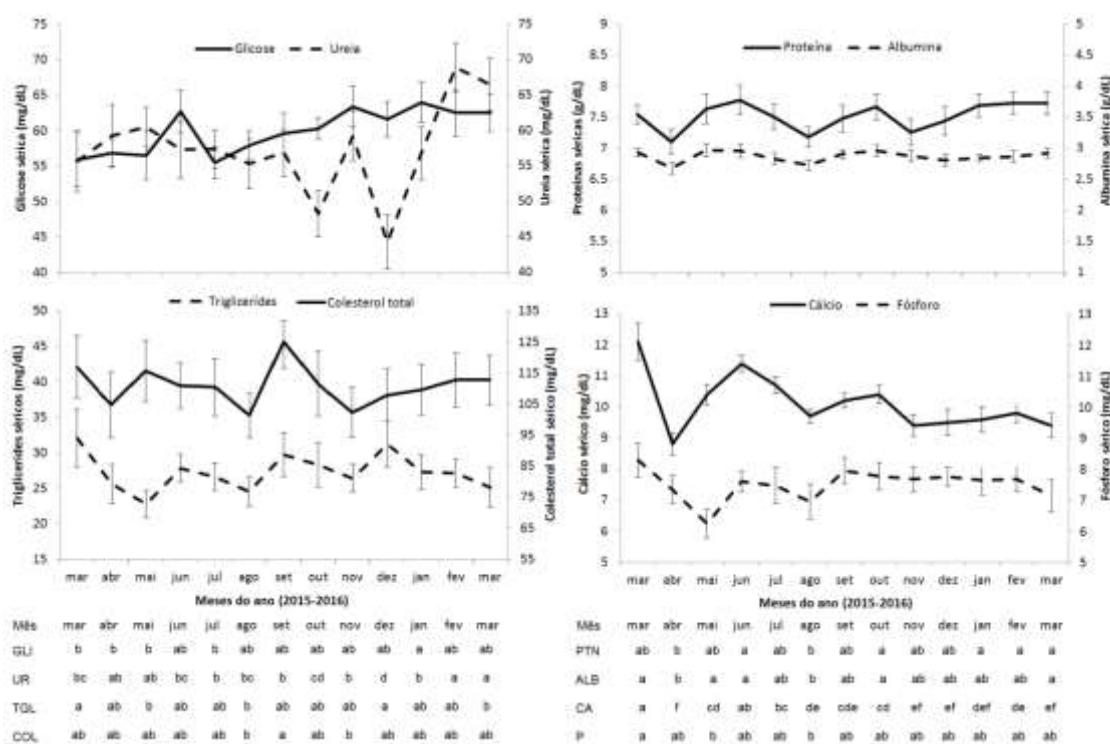


Figura 6. Índices bioquímicos do perfil metabólico de cabras da raça Saanen ao longo dos meses do ano (2015-2016).

A média global da maioria dos metabólitos diferiu de acordo com a ordem de parto, mantendo-se dentro dos valores de referência para cabras da raça Saanen (Tabela 1). A relação cálcio:fósforo global foi 1,4:1 e por ordens de parto foi 1,5:1, 1,6:1 e 1,3:1 em cabras pluríparas, primíparas e nulíparas, respectivamente.

Tabela 1. Valores absolutos (média $\pm$ DP) dos índices bioquímicos de cabras da raça Saanen de distintas ordens de parto

Perfil metabólico	Ordem de parto			Total	Valores de Referência*
	Pluríparas	Primíparas	Nulíparas		
Glicose (mg/dL)	55,3 $\pm$ 3,6 ^c	58,3 $\pm$ 4,5 ^b	66,3 $\pm$ 3,7 ^a	60,0 $\pm$ 3,1	48 – 59
Ureia (mg/dL)	60,7 $\pm$ 8,6 ^b	64,7 $\pm$ 8,3 ^a	47,7 $\pm$ 6,8 ^c	57,4 $\pm$ 6,4	40 – 65
Triglicérides (mg/dL)	25,1 $\pm$ 2,3 ^b	24,3 $\pm$ 3,0 ^b	32,4 $\pm$ 5,7 ^a	27,3 $\pm$ 2,6	9 - 21
Colesterol (mg/dL)	122,4 $\pm$ 10,0 ^a	122,2 $\pm$ 8,8 ^a	89,7 $\pm$ 9,1 ^b	110,9 $\pm$ 6,3	92- 139
Proteína (g/dL)	8,0 $\pm$ 0,2 ^a	7,5 $\pm$ 0,3 ^b	7,1 $\pm$ 0,3 ^c	7,5 $\pm$ 0,2	6,6 – 7,6
Albumina (g/dL)	3,0 $\pm$ 0,1 ^a	3,1 $\pm$ 0,2 ^a	2,6 $\pm$ 0,1 ^b	2,9 $\pm$ 0,1	2,6 – 3,5
Cálcio (mg/dL)	10,0 $\pm$ 1,2	10,1 $\pm$ 1,3	10,1 $\pm$ 0,6	10,1 $\pm$ 0,9	7,9 - 9,5
Fósforo (mg/dL)	7,2 $\pm$ 0,7 ^b	6,9 $\pm$ 0,7 ^b	8,2 $\pm$ 0,4 ^a	7,5 $\pm$ 0,5	4,8 – 8,1

* Mundim et al. (2007).

3.4 Correlações da progesterona sérica com os índices meteorológicos, desempenho ponderal e perfil metabólico

As correlações da P4 sérica por ordem de parto junto as variáveis estudadas pode ser encontrada na tabela 2. Diversas correlações diferiram de acordo com a ordem de parição das cabras, enquanto que outras foram similares. O peso corporal, ECC e proteínas séricas possuíram correlações positivas para a concentração de P4 em cabras nulíparas e primíparas. Interessantemente, as variáveis de temperatura máxima, temperatura mínima e índice pluviométrico tiveram baixas correlações com a P4, mas a luminosidade e escuridão tiveram, respectivamente, correlações moderadas positivas e negativas com a P4 ao longo do ano.

Tabela 2. Correlações entre progesterona sobre todas as variáveis estudadas em cabras da raça Saanen de distintas ordens de parto ao longo de um ano

Índices	Progesterona sérica (P4)			Total
	Nulípara	Primípara	Plurípara	
Peso corporal	0,560	0,337	ns	0.256
ECC	0,536	0,281 ^{*(p=0,06)}	ns	ns
Glicose	ns	0,428	0,294 ^{*(p=0,07)}	ns
Ureia	0,233 ^{*(p=0,08)}	ns	0,413	0,152 ^{*(p=0,07)}
Triglicérides	- 0,256 ^{*(p=0,07)}	ns	- 0,309 ^{*(p=0,06)}	- 0,181
Colesterol	ns	ns	ns	0,163 ^{*(p=0,06)}
Proteína	0,265	0,238 ^{*(p=0,10)}	ns	ns
Albumina	ns	ns	ns	ns
Cálcio	- 0,231 ^{*(p=0,09)}	ns	- 0,444	- 0,243
Fósforo	ns	- 0,318	- 0,410	- 0,238
Temp. Máx.	0,153	- 0,281	- 0,158	- 0,07 ^{*(p=0,07)}
Temp. Mín.	0,186	- 0,210	ns	ns
Luminosidade	0,117	0,443	0,403	- 0,293
Escurecimento	- 0,125	- 0,446	- 0,406	- 0,298
I. pluviométrico	0,180	- 0,199	ns	ns

ns: não significativo

4. Discussão

Ao início do estudo, em Março, verificou-se que 60% das cabras paridas (primíparas e pluríparas) e apenas 10% das cabras nulíparas estavam cíclicas. Em paralelo, constatou-se uma maior janela de ciclicidade de Março até Agosto (outono e inverno) nas cabras paridas contra a concentração de cabras nulíparas cíclicas entre Junho e Julho (inverno). A ciclicidade foi acompanhada de comportamento sexual no capril de Março até Junho e por ovulações sem manifestação de estros no período de Julho a Agosto em todas as ordens de parto. O anestro estacional foi bem caracterizado no período de Setembro até Novembro (primavera). Interessantemente, em Dezembro, sob a influência de interações sociais próximas (efeito-fêmea), todas as cabras nulíparas experimentais expressaram comportamento sexual. Já as cabras paridas

também foram influenciadas, em menor grau, sobre o efeito-fêmea no capril e expressaram comportamento sexual e ovulação com menor persistência da ciclicidade e ovulações sem estro até Março do ano seguinte. É bem conhecida que a expressão de um dado traço (fenótipo) num animal depende da influência combinada de fatores intrínsecos marcados pela genética (genótipo) e fatores extrínsecos, principalmente ambientais. Em caprinos, os principais fatores ambientais que influenciam a reprodução animal são: temperatura, umidade, quantidade e distribuição de chuvas, radiação solar e fotoperíodo, nutrição, manejo do sistema produtivo e interações sociais entre indivíduos dentro da mesma população (CHEMINEAU et al., 2004; DELGADILLO et al., 2015; MORALES et al., 2016; ORIHUELA et al., 2016).

Com relação aos fatores ambientais, constatou-se que o clima local foi ameno e seco no inverno e quente e chuvoso no verão. Além disso, ao fotoperíodo variou de 11-13 horas de luz por dia. Tal situação ambiental caracterizou a condição tropical do estudo a 22° 52' 30' de latitude sul. O índice pluviométrico, temperatura máxima e mínima tiveram baixas correlações negativas e pouca influência sobre o estado cíclico das cabras estudadas. Morales et al. (2016) também relataram a correlação negativa de tais índices sobre a ciclicidade de cabras Crioulas Mexicanas (22 °N). Já Lopes Junior et al. (2001) e Silva et al. (1998) relataram a correlação positiva do período chuvoso com a ciclicidade caprina. Em tais estudos, a qualidade do manejo nutricional anual foi afetado pela condição climática e assim, o viés nutrição pode ter afetado o estado cíclico dos animais. O número de horas de luz (luminosidade) e escuridão, que ditam o fotoperíodo, influenciou moderadamente na resposta estacional das cabras. Interessantemente, o número de horas de luz e escuridão correlacionaram-se positiva e negativamente com a P4 em todas as ordens de parto com maior influência sobre as cabras paridas ($r \sim 0,42$; $p < 0,01$) quando comparado as cabras nulíparas ($r \sim 0,12$; $p < 0,01$). Tal fato, corrobora com os estudos de Delgadillo et al. (2011), a respeito que a refratariedade a dias longos e curtos que seria o fator regulador na transição entre a entrada e saída da estação reprodutiva e não a sensibilidade ao aumento ou diminuição do estímulo luminoso local em cabras sob condições subtropicais. No presente estudo, a estação reprodutiva em todas as ordens de parto concentrou-se no inverno, época de menor intensidade luminosa (2:36 h a mais de escuridão) e

onde começa a aumentar o comprimento do dia. Assim, a refratariedade a queda da luz pode ter sido a responsável pela transição ao anestro. Outro ponto relevante está na diferença da janela de estado cíclico entre as cabras nulíparas e paridas neste período. O fato das cabras paridas terem apresentado um maior período de ciclicidade pode estar relacionado ao maior tempo de vida e adaptação aos fatores ambientais locais (CHEMINEAU et al., 1992a; CHEMINEAU et al., 2004) que diminuíram a influência sobre o seu ritmo endógeno circadiano marcado por mecanismos genéticos (*clock genes*; HAZLERIGG et al., 2004), tais quais poderiam ainda influenciar animais jovens, como as cabras nulíparas.

O peso vivo e ECC não apresentaram variações anuais nas cabras paridas, o que caracterizou uma estabilização contínua, do ponto de vista nutricional, sobre a reprodução das mesmas. É importante ressaltar que o peso vivo, principalmente das pluríparas, e o ECC estavam ligeiramente acima do descrito na literatura para cabras da raça Saanen adultas e lactantes (50-80 kg; 2,5-3,0 ECC; RIBEIRO, 2004). Já as cabras nulíparas apresentaram ganho de peso, dentro do esperado para a categoria, ao longo do estudo. Conforme já demonstrado em estudos prévios (ZARAZAGA et al., 2005; ESTRADA-CORTÉS et al., 2009; MORALES et al., 2016), o peso vivo e ECC possuíram correlações positivas fracas a moderadas nas cabras primíparas (PV, $r = 0,337$; ECC, $r = 0,281$; $p < 0,01$) e nulíparas (PV, $r = 0,560$; ECC, $r = 0,536$; $p < 0,01$), respectivamente, com a P4 sérica. Tal resultado ratifica a importância do correto manejo nutricional no plantel e fornece uma medida de fácil mensuração pelo produtor para acompanhamento de tal.

Enquanto que o peso vivo e o ECC caracteriza uma mensuração mais rústica da nutrição sobre o desempenho animal, os índices bioquímicos fornecem uma avaliação refinada a respeito do estado nutricional e balanço de energia-proteína na dieta dos animais (CASTILLO et al., 2016). Por meio do perfil metabólico, verificaram-se valores médios superiores ou próximos aos limites de referência para a ureia, triglicérides e proteína sérica nas cabras primíparas e pluríparas. Tal resultado apontou para um excesso de energia (triglicérides) e proteína (ureia e proteína) na dieta em tais categorias, corroborando com a dieta descrita na metodologia em que era ofertado um concentrado com 22-24% de proteína bruta, cerca de 2-6% superior as

formulações indicadas para cabras lactantes de alta produção (18-20% de PB; NRC, 2007). Com relação às correlações bioquímicas e a P4 sérica, foram obtidas correlações positivas fracas entre a ureia e a P4 em cabras nulíparas ($r= 0,233$; $p=0,08$) e pluríparas ($r= 0,413$; $p<0,01$), contrapondo o efeito deletério da ureia, descrito por ALVES et al. (2011), sobre a concentração plasmática de P4 e a dinâmica folicular ovariana em cabras Alpina. Possivelmente, o efeito benéfico da ureia sobre a P4 foi apenas um achado secundário e rebote de concentrações superiores de proteínas na circulação que também se correlacionaram positivamente com a P4 em cabras nulíparas ($r= 0,265$; $p<0,01$) e primíparas ($0,238$; $p=0,10$). Houve uma tendência da correlação positiva fraca entre o colesterol global (todas as categorias) e a P4 ($r= 0,163$; $p=0,06$). Tal achado é pertinente, devido a sua participação como precursor de hormônios esteroides (SANGHA, SHARMA e GURAYA, 2002). Com relação ao metabolismo mineral, o fósforo sérico apareceu dentro dos intervalos de referência, mas o cálcio sérico, de acordo dados fornecidos por Mondim et al. (2011), estava discretamente mais elevado. Todavia, Kaneko, Harvey e Bruss (2008) relataram valores de referência para o cálcio (8,9 – 11,7 mg/dL) dentro do encontrado no presente estudo. A relação Ca:P manteve-se no intervalo de 1:1 a 2:1, descrita por Mondim et al. (2011) como sendo a proporção sérica fisiológica para suprir as necessidades de crescimento, formação óssea e manutenção da produção de leite.

As interações sociais fêmea-fêmea e macho-fêmea apresentaram um forte papel neste estudo. Inicialmente, a entrada no bode, em meados de Março até o final de Maio, possivelmente colaborou para que cerca de 90 e 100% das cabras pluríparas e primíparas, respectivamente, estivessem cíclicas até Maio e com comportamento sexual até Junho. Tal comportamento de estro perdurou por um mês (até Junho) após a saída do bode e as ovulações silenciosas por mais três meses até o início do anestro em Setembro. Em adição, embora a estação reprodutiva das cabras paridas tenha englobado todo o período do outono e inverno, apenas foi perceptível até junho onde cessou o comportamento sexual das mesmas. Estudos recentes, conduzidos por Abecia et al. (2015) e Delgadillo et al. (2015) demonstraram que estímulo contínuo em ovelhas (41 °N) e cabras (26 °N) por carneiros e bodes ativos (tratados com fotoperíodo ou implantes de melatonina) foi capaz de estender a

atividade reprodutiva das ovelhas até a primavera e, até mesmo, cessar a inibição fotoperiódica das cabras ao longo do anestro. Igualmente, Ponce et al. (2015) afirmaram que apenas um dia de contato com bodes sexualmente ativos (fotoestimulados) seria o suficiente para estimular a atividade ovulatória em cabras no anestro primaveril (26 °N). Por fim, Bedos et al. (2016) demonstraram que apenas cabras estimuladas por bodes ativos foram capazes de expressar altos níveis de c-Fos (marcador de ativação celular) em duas regiões cerebrais de importância chave na reativação da atividade do GnRH, a área pré-óptica medial (mPOA) e o núcleo arqueado hipotalâmico (ARC). Assim, ratifica-se como condição *sine qua non* que efeito-macho deva ser adotado a partir de machos previamente estimulados pela luz ou melatonina.

Ainda no contexto das interações sociais, verificou-se que no mês de Dezembro, em pleno pico de luminosidade (solstício do verão) e fotoperíodo positivo, cabras nulíparas não-experimentais induzidas farmacologicamente ao estro foram capazes de estimular o comportamento sexual e ovulação em 100% das cabras nulíparas experimentais mantidas na mesma baia (relação 1:1) e em 50% das cabras pluríparas e primíparas mantidas em baias próximas no mesmo galpão. Tal estímulo pontual foi suficiente para manter o estado cíclico em quase todas as cabras nulíparas e parte das cabras paridas até meados de Março. Este resultado reitera a importância do efeito fêmea-fêmea sobre o estímulo do comportamento sexual e entrada na estação reprodutiva. Estudos sobre o efeito fêmea vêm ressaltando a importância da relação fêmeas cíclicas:anestro sobre o estímulo ovulatório destas. Por exemplo, Hogan et al. (2004) não obtiveram nenhuma resposta ovulatória em cinco cabras em anestro quando alocadas junto a uma cabra em estro dentro de um recinto de 5000 m². Entretanto, mais de 75% de cabras em anestro ovularam quando a relação fêmeas cíclicas:anestro era 3:10 e estes animais foram alojados num recinto menor de 100 m² (RESTALL et al, 1995). Assim, a aparente resposta para o estímulo de fêmeas caprinas em anestro está na exposição de um número considerável de fêmeas expressando comportamento sexual e num espaço relativamente limitado, maximizando as interações sociais. Recentemente, Orihuela et al. (2016) demonstraram que ovelhas da raça Suffolk em anestro estacional iniciaram o estado cíclico após 8 a 23 dias da permanência das mesmas com um lote de ovelhas cíclicas da raça Santa Croix

(18 °N).

Os resultados do presente experimento sugerem que devem ser reavaliadas as contribuições relativas do fotoperíodo e do ritmo circadiano endógeno com outros fatores externos no controle da reprodução estacional em cabras da raça Saanen mantidas em condições tropicais. Assim, é aberta uma janela de conjunturas científicas que remetem a técnicas naturais (não farmacêuticas), consideradas verdes, éticas e limpas, no controle da reprodução caprina local.

6. Conclusão

Cabras nulíparas apresentaram a estação reprodutiva no período do inverno enquanto que as cabras primíparas e pluríparas mantiveram-se cíclicas no outono e inverno. Independente da ordem de parto, todos os animais apresentaram anestro estacional marcado na primavera. Interações sociais, a partir de Dezembro, foram capazes de restabelecer, em graus distintos, o estado cíclico nas cabras. Igualmente, índices ambientais e ponderais/metabólicos possuíram baixa e moderada influência, respectivamente, sobre a estacionalidade reprodutiva nas cabras da raça Saanen manejadas sob condições tropicais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa (Projeto 04.12.09.012.00.00) e à FAPERJ pelo apoio financeiro. FZB, NPRA e JFF são bolsistas do CNPq.

7 Referências bibliográficas

- ABECIA, J.A. et al. Continuous exposure to sexually active rams extends estrous activity in ewes in spring. *Theriogenology*, v.84 p.1549–1555, 2015.
- ALVES, N.G. et al. Effect of urea in the diet on ovarian follicular dynamics and plasma progesterone concentration in Alpine goats. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, n.7, p.1512-1518, 2011.
- BEDOS, M. et al. A high level of male sexual activity is necessary for the

activation of the medial preoptic area and the arcuate nucleus during the “male effect” in anestrus goats. *Physiology & Behavior*, v.165, p.173-178, 2016.

BORGES, C.H.P. Custos de produção leite de cabra na região Sudeste do Brasil. In: simposio internacional sobre caprinos e ovinos de corte, 2., set.out.2003, João Pessoa-PB.

CASTILLO, C. et al. Usefulness of metabolic profiling in the assessment of the flock's health status and productive performance. *Small Ruminant Research*, v.142, p.28–30, 2016.

CHEMINEAU, P. et al. Seasonal ovulatory activity exists in tropical Creole female goats and Black Belly ewes subjected to a temperate photoperiod. *BMC Physiology*, v.4, p.12- 23, 2004.

CHEMINEAU, P. et al. Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Ruminant Research*, n.8, p.299-312, 1992a.

CHEMINEAU, P. et al. Seasonality of reproduction and production in farm fishes, birds and mammals. *Animal*, v.1, p.419–423, 2007.

DE SANTIAGO-MIRAMONTES, M.A. et al. Body condition is associated with a shorter breeding season and reduced ovulation rate in subtropical goats. *Animal reproduction science*, v.114, p.175-182, 2009.

DELGADILLO, J.A. et al. Sexually active males prevent the display of seasonal anestrus in female goats. *Hormones and Behavior*, v.69, p.8–15, 2015.

DELGADILLO, J.A. et al. Refractoriness to short and long days determines the end and onset of the breeding season in subtropical goats. *Theriogenology*, v.76, p.1146–1151, 2011.

DETWEILER, G. et al. Body Condition Scores in Goats. In: ANNUAL GOAT FIELD DAY, 23., 2008, Langston. Proceedings... Lagston: Langston University, Langston, 2008, p.127-133.

DUARTE, G. et al. Reproductive seasonality in female goats adapted to a subtropical environment persists independently of food availability. *Domestic Animal Endocrinology*, v.8, n.35, p.362- 370, 2008

ESTRADA-CORTES, E. et al. Nutritional status influences reproductive seasonality in Creole goats: 1. Ovarian activity during seasonal reproductive transitions. *Animal Reproduction Science*, v.116, p.282-290, 2009.

- FATET, A.; PELLICER-RUBIO, M.T.; LEBOEUF, B. Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science*, v.124, p.211–219, 2011.
- GALLEGO-CALVO, L. et al. Role of body condition score and body weight in the control of seasonal reproduction in Blanca Andaluza goats. *Animal reproduction science*, v.151, p.157-163, 2014.
- GONÇALVES, A.L. et al. Avaliação de sistemas de produção de caprinos leiteiros na Região Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, n.2, p.366-376, 2008.
- HAZLERIGG, D.G. et al. Molecular characterization of the long-day response in the Soay sheep, a seasonal mammal. *Current Biology*, v.14, p.334–339, 2004.
- HOGAN, N. et al. Can female–female stimulation of breeding condition occur in dairy goats? *Small Ruminant Research*, v.55, p.21–27, 2004.
- HOLANDA JUNIOR, E.V. et al. *Custo de produção de leite de cabra na região Nordeste*. In: ZOOTECA 2008. João Pessoa, PB: UFPB/ABZ, 2008.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of domestic animals. San Diego: Academic Press, 2008. 932p.
- LOPES JR, E.S. et al. Oestrus behaviour and performance in vivo of Saanen goats raised in northeast of Brazil. *Livestock Research for Rural Development*, v.13, n. 6, 2001.
- MARTIN, G.G.; KADOKAWA, H. “Clean, Green and Ethical” Animal Production. Case Study: Reproductive Efficiency in Small Ruminants. *Journal of Reproduction and Development*, v. 52, p.145-152, 2006.
- MINTON, J.E. et al. Poor reproductive response of anestrus Suffolk ewes to ram exposure is not due to failure to secrete luteinizing hormone acutely. *Journal of Animal Science*, v. 69, p. 3314–3320, 1991.
- MORALES, J.U. et al. Resumption of ovarian activity is modified by non-photoperiodic environmental cues in Criollo goats in tropical latitudes. *Small Ruminant Research*, v.137, p.9-16, 2016.
- MUNDIM, A.V. et al. Influência da ordem e estádios da lactação no perfil bioquímico sanguíneo de cabras da raça Saanen. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.2, p.306-312, 2007.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, NRC. Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and new world camelids. The National Academies Press, Washington DC, 2007, 384p.

- ORIHUELA, A. et al. Close contact with spontaneously cycling Saint Croix ewes triggers cyclic activity in seasonally anestrous Suffolk ewes. *Animal Production Science*, v.56, p.1816–1819, 2016.
- PONCE, J.L. et al. One day of contact with photostimulated bucks is sufficient to induce ovulation in seasonally anestrous goats. *Theriogenology*, v.84, p. 880–886, 2015.
- RESTALL, B.J. et al. The induction of ovulation in anovulatory goats by oestrus females. *Animal Reproduction Science*, v.40, p.299–303, 1995.
- RIBEIRO, S.D.A. Caprinocultura: Criação Racional de Caprinos. 1ed. São Paulo: Nobel, 2004, 318p.
- SANGHA, G.K.; SHARMA, R.K.; GURAYA, S.S. Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small Ruminant Research*, v. 43, n. 1, p. 53–64, 2002.
- SCARAMUZZI, R.J., MARTIN, G.B. The importance of interaction among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43 n.3, p.129-136, 2008.
- SILVA, E. et al. Reproductive performance of Alpine dairy goats in a semi-arid environment of Mexico under a continuous breeding system. *Small Ruminant Research*, v.27, p.79-84, 1998.
- ZARAZAGA, L.A. et al. Effect of plane of nutrition on seasonality reproduction in Spanish Payoya GOATS. *Animal Reproduction Science*, v.87, p. 253-267, 2005.

8. CAPÍTULO 4

Pre-selection test to identify high responders donor goats

Teste de pré seleção para identificar doadoras caprinas de alta resposta

Artigo publicado no periódico: Reproduction in Domestic Animals

Em: Junho de 2016, v. 51(3), p.386-91

Qualis: A2 – Medicina Veterinária

This work was carried out at Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brazil.

Pre-selection test to identify high responders donor goats

Mario Felipe A. Balaro^{a*}; Felipe Z. Brandão^a; Ana Lúcia R.S. Maia^a; Joanna Maria G. Souza-Fabjan^a; Marcela I. Cueto^b; Alejandro E. Gibbons^b; Jeferson F. Fonseca^c

^a *Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, RJ, Brazil.*

^b *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Bariloche, Argentina.*

^c *Embrapa Goats and Sheep, Rodovia MG 133, km 42, CEP 36155-000, Coronel Pacheco, MG, Brazil.*

Author's address (for correspondence): MFA Balaro, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niteroi, RJ, 24230-340, Brazil.
E-mail: mariobalaro@hotmail.com

Contents

The aim of the study was to evaluate the feasibility of pre-selection of high or low responders does prior to the superovulatory protocols. Twenty Saanen does received 800 IU of eCG at the end of long-term progestagen treatment. Fourteen days later, a second progestagen protocol associated with a multiple-dose FSH treatment (5 IU/kg of FSH, in six decreasing doses between Days 4 to 6 of the protocol) were administered. Transrectal ultrasound was used to assess the follicular status at beginning of superovulatory treatments, at the estrus onset and on the seventh day of the estrous cycle for counting corpora lutea (CL). A significant lower number of CL was obtained in eCG-treated in compare to FSH-treated does ($P < 0.05$). A quartic regression was able to explain the relationship between the number of CL in response to both treatments ($r^2 = 0.50$; $P < 0.05$). Seventy percent (14/20) of does maintained the same ovulatory response (high or low) after treatments. The Kappa ($k = 0.40$; $P < 0.05$) and Spearman ($r_s = 0.39$; $P = 0.08$) coefficients were able to show a relationship between treatments. Regarding the follicular status, there is a significant relationship between the number of small follicles ($r = 0.71$; $r^2 = 0.47$; $P < 0.01$) and total follicles ($r = 0.60$; $P < 0.01$) at eCG and first FSH dose with the number of CL. Moreover, it was found a negative relationship between the presence of large follicles and the number of CL in response to eCG treatment ($r = -0.44$; $P < 0.05$), but not from FSH ($P > 0.05$). In conclusion, the screening test with eCG has the potential to identify Saanen does that will better respond to the superovulatory protocol with FSH. In addition, it highlighted the importance of an ultrasound evaluation prior to the beginning of superovulatory treatments with FSH in order to characterize the follicular status and identify potential donors of high ovulatory response in MOET programs in goats.

Keywords: does, follicular population, hormonal treatment, superovulation

Introduction

Goats are significant contributors to the global production of food and fiber. With the increase in world population, goats have an essential role, especially for the economy of developing countries (Pollot and Wilson 2009). In order to optimize breeding systems and commercial gains, the multiple ovulation and embryo transfer (MOET) program appears with the potential to improve the number of offspring produced by genetically valuable goats (Baldassarre and Karatzas 2004).

The success of a MOET program is determined by intrinsic (breed, age, nutritional and reproductive status) and extrinsic (source and purity of hormones and protocols of administration) factors (González-bulnes et al. 2004). Although most of these factors could be controlled, the MOET efficiency remains a challenge, mainly due to the high individual variability in the ovulation rate. Thus, the implementation of MOET programs under field conditions has been limited for economic reasons related to its low reproductive efficiency (Amiridis and Cseh 2012).

In the last decade, researchers have been dedicated to elucidate the role of the ovarian follicular status at the beginning of superovulatory treatment (Menchaca et al. 2002; 2007; 2009) and new protocols have been employed to reach the ideal ovarian status at this time. Nevertheless, the individual variability remains a challenge. It has been proposed the existence of a high intra-individual repeatability in response to successive superovulatory treatments in sheep (Bruno-Galarraga et al. 2014) which could be related to the pool of primordial follicles, intrinsic to each ewe (Torres-Rovira et al. 2014). Thus, the identification of does as high or low responders to superovulatory treatments would be an interesting tool for MOET programs.

Over the last years, few alternatives have been evaluated such as the description of screening hormonal protocols (Davis and Johnstone 1985; Lahoz et al. 2011), as well as Anti-Mullerian Hormone quantification to identify potentially good embryo donors (Monniaux et al. 2011; Torres-Rovira et al. 2014). In sheep, pre-selection tests using a low dose of follicle stimulation hormone (FSH) or equine chorionic gonadotropin (eCG) have shown promising results in selecting prepubertal and adult ewes with good potential for embryo donors (Davis and Johnstone 1985; Lahoz et al. 2011; Torres-Rovira et al.

2014). Recently, it was demonstrated a significant satisfactory correlation ($r^2=0.63$) between the superovulatory responses to the use of a first eCG treatment and a subsequent FSH treatment in sheep donors (Bruno-Galarraga et al. 2015). Therefore, the use of a screening protocol with only eCG, which is much cheaper than FSH, may be helpful to identify the best donors and to eliminate the so-called "individual effect". However, the reliability of the use of such screening test in goats is yet to be determined.

Thus, the aim of this study was to evaluate the feasibility of establishing a pre-selection test by the use of low dose of eCG to identify does as high or low responders, prior to the use of a multiple ovulation FSH treatment. Concomitantly, the effect of follicular status at the beginning of eCG and FSH-superovulatory treatments and their relationship with the number of corpora lutea obtained was assessed.

Material and methods

Experimental conditions and animals

The study was carried out at Santa Clara Farm, located in Coronel Pacheco (Minas Gerais, Brazil) at 21° S latitude under tropical conditions. This research was reviewed and approved by the Animal Care Committee of Universidade Federal Fluminense (number 374) and was conducted under the ethical principles of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science.

Twenty healthy pluriparous Saanen does (4.7 ± 1.6 years old; 2.9 ± 0.3 of body condition score) were used during the non-breeding season (November and December). Animals were kept under intensive management and received 1.300 g/goat/day of concentrate (homemade mixture with 18% of crude protein), alfalfa and ryegrass hay and chopped elephant grass. Water and mineralized salt (Caprinofós[®], Tortuga, São Paulo, Brazil) were provided *ad libitum*.

eCG superovulatory treatment - pre-selection test procedure

This test consisted of the insertion of a progestagen-impregnated intravaginal pessary (60 mg of medroxyprogesterone acetate, Progespon[®], Schering Plough, São Paulo, Brazil) for 14 days, with pessary exchanged at 7th day. A dose of 800 IU IM of eCG (Novormon[®], MSD Saúde Animal, São Paulo,

Brazil) at time of pessary removal was administered. In sequence, the onset and duration of estrous behavior was detected twice daily (7 a.m. and 7 p.m.) from 24 h after pessary removal by adult fertile bucks.

FSH superovulatory treatment -Traditional multiple ovulation procedure

Fourteen days after eCG administration, a second progestagen-impregnated intravaginal pessary was inserted for six days. The superovulatory treatment was described previously by Fonseca (2006). Briefly, a total of 5 IU of FSH IM (Pluset[®], Hertape Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brazil) per kg of body weight was diluted into 20 mL of saline and administered in six decreasing doses (5-5-3-3-2-2 mL) twice daily from the afternoon of Day 4 to Day 7, 12 h after pessary removal. Estrus behavior was detected twice daily (7 a.m. and 7 p.m.) from 24 h after pessary removal with adult fertile bucks. Fifty-four hours after the end of the estrus, all does received 500 IU IM of hCG (Vetecor[®], Hertape Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brazil) to control premature regression of CL.

Ultrasonographic evaluation

Transrectal ultrasound (Mindray Color - M5 VET[™], Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China) equipped with a 7.5 MHz linear transducer was used to assess the ovarian status at the following time: (1) previous to superovulatory treatments to quantify the number of small (2-4 mm), large (> 4 mm) and total follicles; (2) onset of estrus behavior to quantify the large follicles (> 4 mm); and (3) 7th day of the estrous cycle to quantify the number of *corpora lutea* (CL) and persistent follicles (> 8 mm). Does were maintained in a standing position in all procedures. B-mode and Colour Flow Doppler videos of the ovaries were recorded by the same operator for further analyses. The occurrence of premature regression of corpus luteum (PRCL) was also evaluated at the CL count time (7th day of the estrous cycle) by varying obtained in echogenicity and luteal vascularization. Afterwards CL counting, 37.5 µg d-cloprostenol IM (Prolise[®], Tecnopec LTDA, São Paulo, Brazil) was administered to induce CL luteolysis in both treatments.

Indexes of superovulatory response

The following variables for each doe were recorded after both treatments (eCG and FSH): number of small, large and total follicles previously to the superovulatory treatment, number of large follicles at estrous onset, number of CL and persistent follicles on 7th day of the estrous cycle.

A CL cut-off was lineate to divide the total number of does into the different ovulatory responder groups, after both hormonal treatments. According the median of number of CL per treatment, does were grouped into high or low ovulatory responders to eCG (high ≥ 7 ; low < 7 CL) and to FSH treatments (high ≥ 23 ; low < 23 CL), in order to evaluate the recurrence rate between eCG and FSH treatments.

Selection of animals to assess the follicular status influence at the onset of superovulatory treatments on ovulations

The cut-off point for entry in this analysis was the arithmetic average of the number of large follicles obtained at beginning of each treatment (eCG: 5.4; FSH: 4.4). Thus, a total of six goats (from 20 goats) were included with less than five and four large follicles at the beginning of the treatments with eCG and FSH, respectively, for new correlation between treatments, under low influence of large follicles.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using a computer software (SAEG[®] 9.0, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil). Simple linear and quadratic regression analysis and Pearson correlation coefficient were applied to assess the relationship between: (1) the follicular status before eCG or FSH dose and the number of CL obtained per treatment; (2) the number of large follicles at estrous onset and the number of CL obtained per treatment; (3) Number of CL obtained in eCG treatment and FSH treatment; and (4) Number of CL obtained in eCG treatment and FSH treatment (from 6 goats, as described in 2.6.). The Spearman's rank correlation coefficient and Kappa coefficient were used to evaluate the relationship between high or low ovulatory responder does after each treatment. The intra-class correlation coefficient was adopted to assess the repeatability of the number of large follicles found at

estrous onset with the number of CL in response to each treatment. Differences in the occurrence of PRCL and persistent follicles, between treatments, were assessed by Fisher's exact test. For all tests, $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results

Follicular status and number of corpora lutea obtained between treatments

The assessment of follicular population at the moment of eCG administration, showed a mean of 5.4 ± 1.3 small follicles (range: 1-10), 5.3 ± 1.3 large follicles (range: 4-9) and 10.7 ± 2.7 total follicles (range: 7-16). Regarding to the FSH treatment, a mean of 11.0 ± 1.3 small follicles (range: 3-20), 4.4 ± 0.5 large follicles (range: 2-8) and 15.3 ± 1.5 total follicles (range: 8-28) was obtained. A significant lower number of CL was obtained in eCG-treated (9.1 ± 2.3) than FSH-treated does (26.2 ± 1.2). The occurrence of PRCL did not differ ($P > 0.05$) between eCG (20%; 4/20) and FSH treatment (30%; 6/20). Lastly, the frequency of persistent follicles at CL counting differed ($P < 0.05$) between eCG (30%; 6/20) and FSH treatment (90%; 18/20).

Correlations between the follicular status and number of corpora lutea obtained between treatments

Four and six does showed PRCL after treatment with eCG and FSH, respectively. Data from these goats were not used in the following correlations. As noted in table 1, several relationships between follicular population and number of CL were found in both treatments that had a synergic effect when they were considered together. Importantly, positive correlations were obtained between the number of small follicles at first eCG/FSH dose with the number of CL ($r = 0.47$; $P < 0.05$) as well as the negative correlation between the presence of large follicles at eCG dose and number of CL ($r = -0.444$; $P < 0.05$). Furthermore, positive correlations were also obtained between the number of large follicles at estrus onset with the number of CL (eCG: $r = 0.51$; $P < 0.05$ / FSH: $r = 0.70$; $P < 0.05$).

A lower intraclass correlation coefficient was observed between the number of large follicles at the estrous onset and the number of CL in the

treatment with eCG (icc: 0.44; $P < 0.05$) when compared to treatment with FSH (icc: 0.86; $P < 0.05$).

As shown in Figure 1, a significant positive relationship between the number of small follicles at the start of superovulatory treatment and large follicles at estrous onset with the number of CL in the FSH treatment were obtained.

In Table 2 the simple and multiple linear equations are presented to estimate the number of CL from follicular data in both protocols ($n=30$). A good multiple correlation between all collected follicular indexes (small follicles, large, total at the beginning of superovulation and large follicles at estrus onset) was obtained for predicting the number of CL ($r^2=0.86$; $P < 0.05$). However, only the presence of the number of large follicles at estrous onset was enough to estimate the number of CL ($r^2=0.87$; $P < 0.05$). The assessment of the follicular status, prior to superovulatory stimulus, was able to estimate about 50% ($r^2=0.48$; $P < 0.05$) in multiovulatory response. Moreover, the large follicles contributed negatively for the equation. Lastly, only the number of small follicles in the formula was effective to achieve the same index ($r^2=0.49$; $P < 0.05$).

When analyzing ovulation response to both eCG and FSH treatments, in all does ($n=20$), a significant relationship ($r^2=0.498$; $P < 0.05$) between the number of CL in response to each treatment was obtained. However, these data did not show a linear behavior; just a quartic regression was efficient to explain this relationship (Figure 2). From the correlation analyzes of preselected goats ($n=6$), with a lower number of large follicles prior to hormonal stimulation, a linear equation was obtained between treatments ($r=0.76$; $y = 34.98 - 0.54x$; $P=0.07$).

Correlations between the stipulated cutoff point for each treatment

In the current study, the recurrence rate was defined as the superovulatory ovarian response after FSH administration in relation to prior response to eCG treatment. Eight does out of eleven with high ovulatory response to eCG still showed high ovulatory response after FSH treatment (72.7%; 8/11). Six does out of nine with low ovulatory response to eCG treatment still showed low ovulatory response after FSH treatment (66.7%; 6/9). Overall, 14 does out of six still showed high or low response after FSH

treatment (70%; 14/20). The Kappa ($k=0.40$; $P<0.05$) coefficient did show a moderate concordance regarding to donors to be classified as high or low responders between treatments. However, the Spearman coefficient ($r_s=0.39$; $P=0.08$) has just indicated a trend of relationship between them.

Discussion

The assessment of ovarian follicular population at eCG or first FSH dose showed high inter-individual variability. Reasons for these findings could be caused by intrinsic factors, such as the number of primordial follicles at birth, genetic mechanisms, different hormonal doses or by external factors like environmental conditions and nutrition (Mossa et al. 2007). Nevertheless, other studies have shown similar means in the number of small and total follicles in goats (Cueto et al. 2006; Nogueira et al. 2015). Regarding the mean number of CL obtained per treatment, there have been reported similar means after either eCG or FSH-superovulatory treatment (Senthil Kumar et al. 2003). In contrast, other authors reported a lower mean even after the use of a higher dose of eCG (1500 IU) (Holtz et al. 2012).

The use of eCG for superovulation treatments has been associated with a greater occurrence of PRCL than FSH treatments (Riesenberg et al. 2001; Senthil Kumar et al. 2003). However, this was not observed in the present study (eCG: 20% vs. FSH: 30%), even after the single dose of hCG (500 IU) in FSH-treated goats, as recommended previously by Saharrea et al. (1998). More recently, Shabankareh et al. (2012) suggested with promising results a single dose of hCG (500 IU) when starting a superovulatory treatment and in the following two days.

The greater frequency of persistent follicles in FSH-treated compared to eCG-treated does may be explained by the use of hCG. As this hormone has a long half-life (39.4 H; Saleh et al. 2012) and was administered after end of estrus it may have continued to stimulate follicle growth from the subsequent follicular wave culminating with greater number of large follicles quantified on 7th day of the cycle.

The current study has found a significant relationship between the numbers of small and total follicles at eCG and at first FSH dose with the

number of CL in response to treatments. These positive relationships have been found in ewes (González-bulnes et al. 2004) or not (Bruno-Galarraga et al. 2015). Similarly, the importance of the start of a superovulatory treatment in the presence of a pool of emerging follicles was already demonstrated in goats (Menchaca et al. 2002; 2007). However, to the authors' knowledge, this is the first report that demonstrates a positive significant relationship ($r=0.70$; $P<0.01$) between the number of small follicles at superovulation time with the response of the goat donor, regardless of the source of hormonal stimulation (eCG or FSH). It was also proposed an equation ($y = 21.57 + 0.43x$) that can help to predict the superovulatory response by FSH in goats from the prior ultrasound assessment of the number of small follicles.

The negative relationship found between the number of large follicles at superovulation time and the number of CL, in agreement with previous studies in Alpine goats (Menchaca et al. 2002; 2007) and Merino ewes (Bruno-Galarraga et al. 2015) under subtropical conditions. Therefore, it highlights the importance of the starting a superovulatory treatment in the absence of large follicles. Moreover, the number of large follicles at estrous onset in FSH treatment has demonstrated better correlations with the number of CL than in eCG treatment. The fact can be clarified by short half-life of FSH (5h – cattle; Laster 1972) and its synchronized stimulation of a pool of follicles unlike longer biological action of eCG (40 h - cattle; Dieleman et al. 1993). This is an important tool when there is the need to check if the goat donor will be responding or not to FSH-superovulatory treatment seven days before counting of CL. In this way, it was proposed an equation ($y = 4,279 + 0,776x$; $r^2=0.87$; $P<0.01$) that can help to estimate the number of ovulations from the counting of large follicles at estrous onset after superovulatory treatment.

In the current study, from the total number of experimental goats ($n=20$), it was not found a linear behavior in the relationship between the number of CL obtained in response after each treatment (eCG vs. FSH). Just a quartic regression was able to partially elucidate ($r^2=0,498$; $P<0.01$) the relationship between them. However, when it was performed the pre-selection of goats that had less influence of large follicles at the beginning of superovulatory protocols, a linear correlation ($r^2=0.48$; $P=0.07$) was obtained. Thus, it was proved the existing bias in carrying out the screening test with eCG under presence of

large follicles. Using a similar methodology adopted in this study, other authors also demonstrated a linear correlation response ($r^2=0.63$) to FSH from the previous screening test with eCG in sheep (Bruno-Galarraga et al. 2015). However, in their research, sheep had a lower number of large follicles as compared to those observed in the present study in goats. Thus, it is important to consider the role of follicular status and the differences between small ruminants (goats and sheep) on superovulatory responses. Furthermore, it is suggested to synchronize follicular emergency in goats when adopting the screening methodology proposal, especially in the breeding season.

The stipulated cut-off point from the median, measure of central tendency, was effective in the identification of 70% (14/20) of goats with high or low potential ovulatory response. Other authors have indicated the even division of the total number of animals as the cut-off point for Merino sheep with high or low potential ovulatory response reaching a 84% (26/31) of recurrence rate (Bruno-Galarraga et al. 2015). Thus, different statistical methodologies can be adopted in order to obtain these indices in small ruminants.

The follicular status, in particular the presence of large follicles prior to the beginning of superovulation treatments unfavorably influenced multiple ovulation rate. The positive relationship found between the number of small follicles and superovulatory response highlights the importance to synchronize follicular emergency in goats when performing multiple ovulation treatments.

It was concluded that the screening protocol with eCG has the potential to identify Saanen goats that will better respond to the FSH treatment. In addition, it highlighted the importance of an ultrasound assessment prior to the beginning of superovulation treatments with FSH in order to characterize the follicular status and identify potential donors with probable high ovulatory response for MOET programs in goats.

Acknowledgements

Authors thank Embrapa (Project 04.12.09.012.00.00) for financial support. FZB and JFF are fellows of the CNPq and JMGSF of CAPES.

Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

Author contributions

We declare that all authors have made substantial contributions to the research and manuscript as follow: Balaro contributed to design and data acquisition of the experiment, analysis and to drafting the article; Maia contributed to data acquisition of the experiment and revision of the manuscript; Brandão, Souza-Fabjan, Cueto and Gibbons and Fonseca contributed to the conception and design of the experiment, data interpretation and final revision of the manuscript.

Tables

Table 1.

Pearson correlations obtained per treatment (eCG/FSH) or both treatments between the number of CLs and follicular data in goats

Number of CLs	eCG (n=16)	FSH (n=14)	eCG + FSH (n=30)
Small follicles at start of treatment	0.490**	0.451**	0.701*
Large follicles at start of treatment	- 0.444**	- 0.100	- 0.239***
Total follicles at start of treatment	0.177	0.380***	0.600*
Large follicles at estrus onset	0.508**	0.704*	0.941*

* P<0.01; ** P<0.05; ***P<0.10.

Table 2.

Simple and multiple linear equations to estimate the number of corpora lutea from follicular data at the beginning of superovulatory eCG and FSH treatments and at estrus onset in goats

Follicles	Equations	r² (P<0.05)
SFOL+LFOL+TFOL+	CL = 3.89 + 0.21 _{FOLG} +	0.86
LFOLE	0.0 _{FOLT} + 0.85 _{FOLGE} - 0.22 _{FOLP}	
SFOL+LFOL	CL = 6.97 + 1.48 _{FOLP} - 0.54 _{FOLG}	0.48
SFOL	CL = 4.09 + 1.51 _{FOLP}	0.49
TFOL	CL = 1.27 _{FOLT} - 0.004	0.36
LFOLE	CL = 4.28 + 0.77 _{FOLGE}	0.87

Acronyms: SFOL: small follicles; LFOL: large follicles; TFOLT: total follicles; LFOLE: Large follicles at estrus onset.

Figures and legends

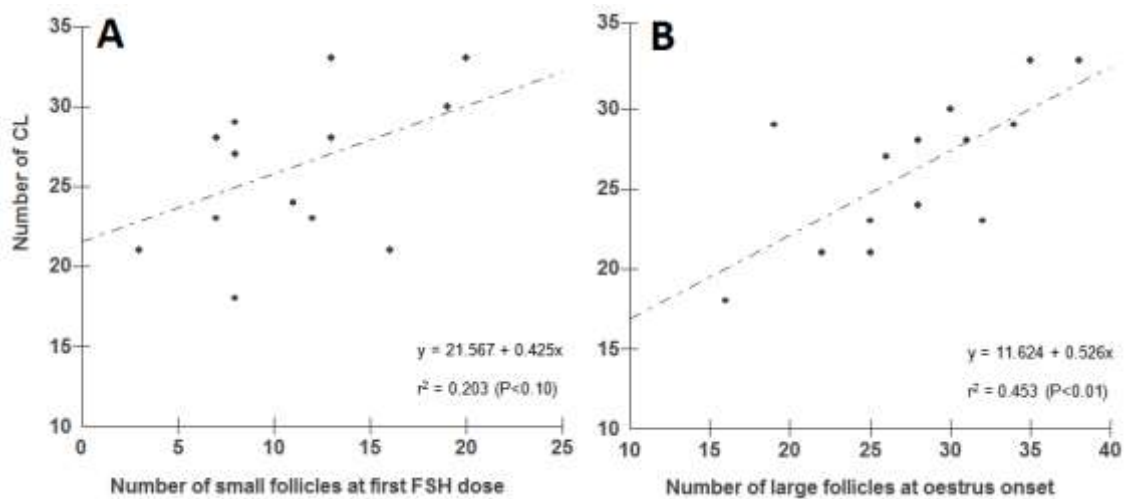


Figure 1. Relationship between (A) the number of small follicles at first FSH dose; and (B) the number of large follicles at estrus onset in FSH treatment with the number of *corpora lutea* in goats.

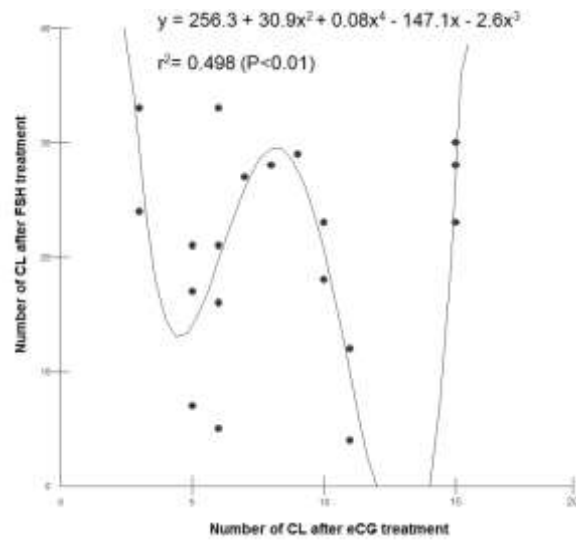


Figure 2. Relationship between the number of corpora lutea in response either to eCG or FSH treatments in goats.

References

- Amiridis GS, Cseh S, 2012: Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Anim Reprod Sci* 130, 152-61.
- Baldassarre H, Karatzas CN, 2004: Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci* 82-83, 255-66.
- Bruno-Galarraga M, Cueto M, Gibbons A, Pereyra-Bonnet F, Subiabre M, González-Bulnes A, 2015: Preselection of high and low ovulatory responders in sheep multiple ovulation and embryo transfer programs. *Theriogenology* 84, 784-90.
- Bruno-Galarraga MM, Cueto M, Gibbons AE, Pereyra-Bonnet F, Catalano R, Gonzalez-Bulnes A, 2014: Repeatability of superovulatory response to successive FSH treatments in Merino Sheep. *Small Ruminant Res* 120, 84-9.
- Cueto M, Gibbons A, Alberio R, Taddeo H, Gonzalez-Bulnes A, 2006: Timing of emergence of ovulatory follicles in polyovulatory goats. *Anim Reprod Sci* 91, 275-84.
- Davis GH, Johnstone PD, 1985: Ovulation response to pregnant mares' serum gonadotrophin in prepubertal ewe lambs of different Booroola genotypes. *Anim Reprod Sci* 9, 145-51.
- Dieleman S, Bevers M, Vos P, de Loos F, 1993: PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology* 39, 25-42.
- Fonseca JF, 2006: Alguns aspectos da transferência de embriões em caprinos. *Acta Sci Vet* 34, 65-70.
- González-bulnes A, Baird DT, Campbell BK, Cocero MJ, García-García RM, Inskip EK, López-Sebastián A, McNeilly AS, Santiago-Moreno J, Souza CJ, Veiga-López A, 2004: Multiple factors affecting the efficiency of multiple

ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod Fertil Dev* 16, 421-35.

Holtz W, Wang X, El-Gayar M, Knight PG, 2012: The effect of exogenous gonadotropins on ovarian function in goats actively immunized against inhibin. *Theriogenology* 77, 253-59.

Lahoz B, Alabart JL, Jurado JJ, Calvo JH, Martínez-Royo A, Fantova E, Folch J, 2011: Effect of the FecXR polymorphism in the bone morphogenetic protein 15 gene on natural or equine chorionic gonadotropin-induced ovulation rate and litter size in Rasa Aragonesa ewes and implications for on-farm application. *J Anim Sci* 89, 3522-30.

Laster DB. 1972: Disappearance of and uptake of ¹²⁵I FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J Reprod Fertil* 30, 407-415.

Menchaca A, Pinczak A, Rubianes E, 2002: Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. *Theriogenology* 58, 1713–21.

Menchaca A, Vilarino M, Crispo M, Pinczak A, Rubianes E, 2007: Day 0 protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology* 68, 1111-17.

Menchaca A, Vilariño M, Pinczak A, Kmaid S, Saldaña JM, 2009: Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology* 72, 477-83.

Monniaux D, Baril G, Laine AL, Jarrier P, Poulin N, Cognié J, Fabre S, 2011: Anti-Mullerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. *Reproduction* 142, 845-54.

Mossa F, Duffy P, Naitana S, Lonergan P, Evans AC, 2007: Association between numbers of ovarian follicles in the first follicle wave and superovulatory response in ewes. *Anim Reprod Sci* 100, 391-6.

Nogueira DM, Cavalieri J, Gummow B, Parker AJ, 2015: Comparison of follicular dynamics and hormone profiles in Boer goats examined during the breeding and non-breeding seasons in the tropics of Queensland, Australia. *Small Ruminant Res* 125, 93-100.

Pollo G, Wilson RT, 2009: Sheep and goats for diverse products and profits. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations – FAO Diversification booklet n. 9, 42p.

Riesenberg S, Meinecke-tillman S, Meinecke B, 2001: Estradiol 17- β and progesterone in the peripheral blood plasma of goats following superovulation with a single dose of pFSH, hMG or eCG. *Small Rumin Res* 40, 73-82.

Saharrea A, Valencia J, Balcázar A, Medja O, Cerbón JL, Caballero V, Zarco L, 1998: Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology* 50, 1039-52.

Saleh M, Shahin M, Wuttke W, Gauly, M, Holtz W, 2012: Pharmacokinetics of human chorionic gonadotropin after i.m. administration in goats (*Capra hircus*). *Reproduction* 144, 77-81.

Senthil Kumar P, Saravanan D, Rajasundaram RC, Selvaraju M, Kathiresan D, 2003: Serum oestradiol and progesterone profiles and their relationship with superovulatory responses in Tellicherry goats treated with eCG and FSH. *Small Ruminant Res* 49, 69-77.

Shabankareh HK, Seyedhashemi SB, Torki M, Kelidari H, Abdolmohammadi A, 2012: Effects of repeated administration of hCG on follicular and luteal characteristics and serum progesterone concentrations in eCG-superovulated Sanjabi ewes. *Trop Anim Health Prod* 44, 1865-71.

Torres-Rovira L, González-Bulnes A, Succu S, Spezzigu A, Manca M, Leoni G, Sanna M, Pirino S, Gallus M, Naitana S, Berlinguer, F, 2014: Predictive value of antral follicle count and anti-mullerian hormone for follicle and oocyte developmental competence during the early prepubertal period in a sheep model. *Reprod Fertil Dev* 26, 1094-106.

9. CONCLUSÕES

A mensuração do fluxo vascular luteal (US doppler colorido) é mais eficiente a respeito do comportamento e funcionalidade do CL ao longo da fase luteal (crescimento, estática e regressão) quando comparado a mensuração dos valores biométricos (US modo-B). Indica-se a avaliação do número de pixels ao visar a pesquisa básica da funcionalidade luteal em virtude de sua melhor correlação com a P4 plasmática. Já a avaliação subjetiva vascular, pode ser adotada a campo devido a maior praticidade e similar padrão de correlação com a P4 e pontos de corte para a funcionalidade luteal.

As cabras nulíparas apresentaram a estação reprodutiva no período do inverno enquanto que as cabras primíparas e pluríparas mantiveram-se cíclicas no outono e inverno. Independente da ordem de parto, todos os animais apresentaram anestro estacional marcado na primavera. Interações sociais, a partir de Dezembro, foram capazes de restabelecer, em graus distintos, o estado cíclico nas cabras experimentais. Igualmente, índices ambientais e ponderais/metabólicos possuíram baixa e moderada influência, respectivamente, sobre a estacionalidade reprodutiva nas cabras da raça Saanen manejadas sob condições tropicais.

O protocolo de triagem com eCG pode ser adotado no intuito de identificar cabras Saanen que irão melhor responder ao protocolo com FSH. Ademais, é destacada a importância da avaliação ultrassonografia prévia ao início de tratamentos superovulatórios com FSH a fim de caracterizar o estado folicular ovariano e identificar as potenciais doadoras de alta resposta ovulatória em programas de MOET em caprinos.

10. PERSPECTIVAS

O uso da tecnologia ultrassonográfica Color Doppler, associada a uma análise quantitativa computacional, na avaliação da dinâmica luteal em caprinos encetou novos panoramas para o uso desta metodologia na pesquisa básica visando melhores compreensões morfofuncionais do corpo lúteo em fêmeas gestantes e não gestantes. Igualmente, contribuiu para novos rumos da pesquisa aplicada e rotina do Médico Veterinário de campo, na aplicabilidade dos pontos de corte fornecidos, pela análise Doppler subjetiva, para a interpretação da funcionalidade luteal de fêmeas caprinas e possíveis receptoras de embriões em programas MOET ou outras biotécnicas assistidas.

A partir do perfil de estacionalidade reprodutiva encontrado, sugere-se que devem ser repensados as contribuições relativas do fotoperíodo e do ritmo circadiano endógeno contra outros fatores externos no controle da reprodução estacional em cabras da raça Saanen mantidas em condições tropicais. Assim, é aberta uma janela de conjunturas científicas que remetem a técnicas naturais (não farmacêuticas), consideradas verdes, éticas e limpas, no controle da reprodução caprina local.

Foi testado e oferecido um protocolo hormonal, prático e menos oneroso, a base da eCG para a identificação de cabras da raça Saanen que irão melhor responder ao protocolo superovulatório tradicional com FSH em programas MOET. Igualmente, foi ratificada a incorporação de avaliações ultrassonográficas previamente ao início de estímulos superovulatórios a fim de caracterizar o estado folicular ovariano e identificar as potenciais doadoras de alta resposta ovulatória. Assim, o estudo contribuiu para a compreensão dos alguns fatores relacionados ao potencial intrínseco da doadora de embriões e forneceu ferramentas que atuam como guia no incremento dos índices obtidos em programas MOET em caprinos.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORGES, C.H.P. Custos de produção leite de cabra na região Sudeste do Brasil. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2., set.out.2003, João Pessoa-PB.

GARCIA, J.F. Contribuição Brasileira à Produção Mundial de Embriões Animais. *Revista CFMV*, n. 46, p. 80-81, 2009.

GONÇALVES, A.L. et al. Avaliação de sistemas de produção de caprinos leiteiros na Região Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, n.2, p.366-376, 2008.

HOLANDA JUNIOR, E.V. et al. *Custo de produção de leite de cabra na região Nordeste*. In: ZOOTECA 2008. João Pessoa, PB: UFPB/ABZ, 2008.

HOLANDA JUNIOR, E.V.; FRANÇA, F.M.C.; LOBO, R.N.B. *Desempenho econômico da produção familiar de leite de cabra no Rio Grande do Norte*. Comunicado Técnico 7, Dezembro, 2006.

KINGHORN, B.; VAN DER WERF, J.; RYAN, M. *Melhoramento animal : uso de novas tecnologias*. Piracicaba: FEALQ, 2006. 367p.

12. ANEXOS

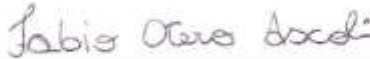
ANEXO 1 - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Fluminense, nº 374/2013.



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 nº 374, intitulado "SUPEROVULAÇÃO, FUNÇÃO LUTEAL E VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES CAPRINOS DE RAÇAS EXÓTICAS E NATURALIZADAS" sob a orientação do Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão da Faculdade de Veterinária 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 9 de maio de 2013. Este certificado é válido por dois a partir da data da sua aprovação.

Niterói, 9 de maio de 2013.


Presidente da C.E.U.A.