UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

O EFEITO DA hCG, eCG E pFSH SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS DO CORPO LÚTEO DE CABRAS APÓS A INDUÇÃO DO ESTRO SINCRONIZADO

Juliane Teramachi Trevizan

Médica Veterinária

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

O EFEITO DA hCG, eCG E pFSH SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS DO CORPO LÚTEO DE CABRAS APÓS A INDUÇÃO DO ESTRO SINCRONIZADO

Discente: Juliane Teramachi Trevizan

Orientadora: Profa. Dra. Maria Emília Franco Oliveira

Coorientador: Dr. Jeferson Ferreira Fonseca

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área Reprodução Animal.

2018

T814e

Trevizan, Juliane Teramachi

O efeito da hCG, eCG e pFSH sobre as características morfológicas e funcionais do corpo lúteo de cabras após a indução do estro sincronizado / Juliane Teramachi Trevizan. -- Jaboticabal, 2018

49 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Maria Emilia Franco Oliveira

Coorientadora: Jeferson Ferreira da Fonseca

1. Doppler Colorido. 2. Ecogeneidade,. 3. Heterogeneidade. 4. Ultrassonografia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: O EFEITO DA hCG, eCG E pFSH SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS DO CORPO LÚTEO DE CABRAS APÓS A INDUÇÃO DO ESTRO SINCRONIZADO

AUTORA: JULIANE TERAMACHI TREVIZAN
ORIENTADORA: MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA
COORIENTADOR: JEFERSON FERREIRA DA FONSECA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA
Depto de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pós-doutoranda LUCIANA CRISTINA PADILHA NAKAGHI
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pesquisadora Dra. ERIKA DA SILVA CARVALHO MORANI
INPRENHA / Top in Life Biotecnologia e Genética Animal - Jaboticabal/SP

Prof. Dr. GUILHERME PUGLIESI
Departamento de Reprodução Animal-FMVZ/USP / Pirassununga/SP

Jaboticabal, 25 de junho de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Juliane Teramachi Trevizan – nasceu em Ivinhema-MS, no dia 2 do mês de dezembro de 1987; concluiu o ensino médio no Colégio Professora Maria Eunides de Melo, na cidade de Ivinhema-MS, em dezembro de 2004. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária no Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN, na cidade de Dourados – MS, em fevereiro de 2005. Concluiu o curso superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2008. Ingressou no programa de Residência de Residência Médico Veterinária, na área de Reprodução Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista – UNESP entre fevereiro de 2009 a janeiro de 2011. Ingressou no curso de pós-graduação, nível de Mestrado em março de 2011 a julho de 2013, sob orientação da Adjunta Marion Burkhardt de Koivisto, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Em março de 2014 iniciou na mesma instituição curso de pós-graduação, nível doutorado, sob orientação da Profa. Dra. Maria Emília Franco Oliveira, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal.

AGRADECIMENTOS

À minha família e em especial a Setsuko Teramachi (avó) e Daniel Henrique Panosso, pelo carinho e força para concretização desta etapa e por serem meus maiores incentivadores.

À minha orientadora Profa. Maria Emília Franco Oliveira que me acolheu com todo o carinho em um momento tão delicado, por ter acredito em minha capacidade e por ter compartilhado grande parte do seu tempo e conhecimento. Obrigada por ter sido mais que uma orientadora, mas também uma amiga, uma conselheira e uma incentivadora. Enfim, por ter me mostrado o verdadeiro papel de um orientador.

Ao meu coorientador e pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Dr. Jeferson Ferreira Fonseca, que me recebeu de braços abertos em sua equipe e por ter dedicado tempo, conhecimento e recursos para a concretização do projeto.

Ao meu amigo de longa data Maurício Desck, por me receber em sua casa e por todo apoio que tive durante minha mudança para Juiz de Fora – MG.

À Embrapa Caprinos e Ovinos, pela disponibilização dos recursos financeiros e estruturais para o desenvolvimento do projeto, mas também pelas amizades ali construídas (Raquel, Vanessa, Sâmila, Marina, Jader, Camila).

As minhas queridas estagiárias Ana Carolina Pedrosa, Viviane Brair Lopes e Isabel Cosentino Oliveira que dedicaram tempo e esforços físicos e mentais; vencendo muitas vezes o cansaço para cumprirmos cada etapa do experimento. Obrigada pela amizade que construímos e pelos momentos inesquecíveis que passamos juntas.

À Dra. Ana Lúcia Maia que com muita paciência e simpatia me explicou cada detalhe das instalações da Embrapa e também por ter compartilhado parte do seu tempo e conhecimento durante meu período de treinamento.

Ao Dr. Mário Balaro que se deslocou do Rio de Janeiro para Coronel Pacheco – MG para me ajudar no delineamento experimental e por ter divido sua experiência técnica e prática em ultrassonografia Doppler Colorido.

Ao Dr. Humberto e Sra. Marlene por ter aberto as portas de seu capril e por terem disponibilizados os animais para realização do estudo. Agradeço também ao Sr. Joaquim e à Imaculada Conceição funcionários do capril pela companhia, confiança, amizade e alegria que ali construímos.

Aos meus amigos de Araçatuba e Jaboticabal -SP: Luiz Gustavo Narciso, Eva Liliane Silva, Carlos Henrique Cancelli, Jefferson Figueira Fonseca, Caroline Facion, Paula Milena, Tabata, Ana Carolina Borsanelli, Natalia Cristina Souza, Milena, Simone e em especial a Laíza Silva.

Aos professores Dr. Joaquim Mansano Garcia, Dra. Erika da Silva Carvalho Morani, Dr. Guilherme Pugliesi e Dra. Luciana Cristina Padilha Nakaghi, pela valiosa participação na banca examinadora, com correções e dicas imprescindíveis.

Ao professor Luís Guilherme de Oliveira a quem tive a oportunidade de realizar o estágio docência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A Embrapa Caprinos e Ovinos de Coronel Pacheco – MG, por fornecerem recursos financeiros e estruturais para execução do projeto.

A todos os animais utilizados neste projeto.

SUMÁRIO

PÁGINA

LISTA DE ABREVIATURAS..... iii
LISTA DE TABELAS...... iv
RESUMO..... v
ABSTRACT..... vii
1 INTRODUÇÃO..... 1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 4
2.1 Fisiologia Reprodutiva e Estacionalidade..... 4
2.1.1 Ciclo Ovariano..... 5
2.1.1.1 Fase Folicular..... 5
2.1.1.2 Fase Folicular no Período de Anestro..... 7
2.1.2.1 Fase Luteal..... 8
2.1.2.2 Luteinização..... 9
2.1.2.3 Corpo lúteo..... 11
2.1.2.4 Desenvolvimento e Regressão do Corpo Lúteo..... 12
2.2.3 Ciclo Estral..... 14
2.2.3.1 Características Comportamentais..... 15
3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 19
3.1 Condições Éticas e Experimentais..... 19
3.2 Protocolos de Indução e Sincronização do Estro..... 19
3.3 Comportamento Estral e Acasalamento..... 20
3.4 Avaliações Ultrassonográficas..... 21
3.5 Dinâmica Folicular..... 21
3.6 Dinâmica Luteal..... 21
3.7 Análise Estatística..... 22
4 RESULTADOS..... 23
4.1 Dinâmica Folicular..... 23
4.2 Comportamento Estral e Taxas de Concepção..... 24
4.3 Dinâmica Luteal..... 25
5 DISCUSSÃO..... 32
6 CONCLUSÃO..... 39
7 REFERÊNCIAS..... 40

Embrapa Gado de Leite

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Impactos de Aplicações de conhecimentos sobre Distúrbios Reprodutivos na Eficiência Reprodutiva de Caprinos Leiteiros", protocolada sob o CEUA nº 3050060218, sob a responsabilidade de **Jeferson Ferreira da Fonseca** *e equipe; Juliane Teramachi Trevizan* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (CEUA/EGL) na reunião de 03/05/2018.

We certify that the proposal "Impacts of application of knowledge of reproductive disorders on Reproductive Efficiency in Dairy Goats", utilizing 728 Caprines (males and females), protocol number CEUA 3050060218, under the responsibility of **Jeferson Ferreira da Fonseca** *and team; Juliane Teramachi Trevizan* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Embrapa Gado de Leite Corporate (CEUA/EGL) in the meeting of 05/03/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 05/2018 a 05/2021 Área: Núcleo Produção E Bem Estar Animal

Origem:	Campo Experimental José Henrique Bruschi						
Espécie:	Caprinos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 6 anos	N:	48
Linhagem:	Caprinos leiteiros			Peso:	35 a 75 kg		
Origem:	Fazenda Particular						
Espécie:	Caprinos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 6 anos	N:	680
Linhagem:	Caprinos leiteiros			Peso:	35 a 75 kg		

Resumo: Este projeto tem por objetivo desenvolver, aplicar e avaliar impactos de ferramentas de reprodução assistida sobre a eficiência reprodutiva de caprinos leiteiros. A proposta está focada na identificação, tratamento e prevenção de problemas reprodutivos em caprinos leiteiros e transferência de tecnologia para o setor técnico. Para tanto, pretende-se (1) caracterizar a prevalência clínica-ultrassonográfica de patologias reprodutivas com vistas à melhor abordagem de tratamento e prevenção destas patologias nos animais acometidos; (2) analisar o perfil de proteínas do fluído uterino; (3) caracterizar economicamente o impacto destas patologias sobre a eficiência produtiva dos rebanhos. A hidrometra é o principal problema reprodutivo de caprinos leiteiros e, por consequência, aquele que mais compromete a eficiência produtiva do rebanho. Alvo de projeto em finalização, a amplitude dos resultados observados e identificação de outras necessidades de estudo apontaram para a necessidade de uma abordagem mais aprofundada do tema e outras patologias reprodutivas. Assim, a presente proposta manterá atividades focadas no levantamento e monitoramento das características reprodutivas dos rebanhos com ênfase na prevalência de hidrometra e alternativas para prevenção, estudo da sua etiologia, diagnóstico precoce, tratamento e utilização dos animais acometidos e também na sua prevenção. Características endócrinas, genéticas e econômicas também serão estudadas no contexto das patologias reprodutivas. A proteômica será utilizada para comparar o fluído uterino de fêmeas acometidas por hidrometra com fêmeas não acometidas por esta patologia. As avaliações genética e genômica poderão identificar famílias de animais mais susceptíveis e marcadores para distúrbios reprodutivos capazes de identificar precocemente animais com menor ou maior potencial para apresentar determinadas patologias. Uma das hipóteses para ocorrência da hidrometra está associada às condições de nutrição dos animais e, por este motivo, um monitoramento do manejo nutricional aplicado nos rebanhos colaboradores será acompanhado e avaliado em condições controladas de experimentação. Treinamento em manejo reprodutivo será dado para colaboradores de rebanhos associados.

Local do experimento: CJHB e rebanhos associados de caprinos leiteiros na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. Cabe a instituição líder (Embrapa) prover todo o material de consumo e equipamentos necessários para a condução das práticas experimentais. Aos rebanhos parceiros cabe a manutenção dos animais nos moldes dos sistema de produção explorados/adotados nos criatórios conforme normas técnicas e categorias animais exploradas.

LISTA DE ABREVIATURAS

3βHSH 3β-hidroxiesteroide desidrogenase
ANPT 1 : Angiopoentina tipo 1.
ANPT 2: Angiopoentina tipo 2.
Cm^2: Centímetros ao quadrado.
Cdks: Quinases dependentes de ciclinas.
CYP_{450}: Citocromo P 450.
eCG: Gonadotrofina coriônica equina.
FSH: Hormônio folículo estimulante.
FGF-1: Fator de crescimento fibroblástico 1.
FGF-2: Fator de crescimento fibroblástico 2.
GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas.
HDL: Lipoproteínas de alta densidade.
hCG: Gonadotrofina coriônica humana.
IGF-1: Fator de crescimento insulina tipo 1.
IGF-2: Fator de crescimento insulina tipo 2.
Kg: Quilogramas.
LH: Hormônio luteinizante.
MAP: Medroxiprogesterona
MEC: Matriz extracelular
mm: Milímetros.
mm^3: Milímetros cúbico.
Modo B: Modo Bidimensional.
PKA: Proteína quinase.
STARs: Proteínas regulatórias aguda esteroidogênicas.
$TIMP_3$: Inibidores da matriz de metaloproteinases.
VNP: Valor numérico de pixels médio.
RUNX 1: Fator de transcrição relacionado Runt 1.
RUNX 2: Fator de transcrição relacionado Runt 2.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Média (± erro padrão) da dinâmica folicular em cabras leiteiras Toggenburg submetidas à indução do estro sincronizado com acetato de medroxiprogesterona (MAP, 6 dias), d-cloprostenol e diferentes gonadotrofinas (hCG – 300 UI, eCG – 200 UI ou pFSH – 30 UI), 24 h antes da remoção da esponja, durante o período de transição sazonal (dezembro, 21ºS).

Tabela 2 Média (± erro padrão) de parâmetros de estro, taxa de concepção e prenhez em cabras leiteiras Toggenburg submetidas ao protocolo de indução e sincronização do estro de curta duração (MAP, 6 dias) com diferentes gonadotrofinas (hCG – 300 UI, eCG – 200 UI ou pFSH – 30 UI), no período de transição sazonal (dezembro, 21ºS).

Tabela 3 Média (± erro padrão) de parâmetros de corpos lúteos formados (D 5 ao 28) após indução do estro sincronizado com acetato de medroxiprogesterona (MAP, 6 dias), d-cloprostenol e diferentes gonadotrofinas (hCG – 300 UI, eCG – 200 UI ou pFSH – 30 UI), 24 horas antes da remoção da esponja, no período de transição sazonal (dezembro, 21°S).

Tabela 4 Média (± erro padrão) de parâmetros de corpos lúteos formados (D 5 ao 28) de cabra prenhes e não prenhe, após indução do estro sincronizado com acetato de medroxiprogesterona (MAP, 6 dias), d-cloprostenol e diferentes gonadotrofinas (hCG – 300 UI, eCG – 200 UI ou pFSH – 30 UI), 24 horas antes da remoção da esponja, durante o período de transição sazonal (dezembro, 21°S).

Tabela 5 Média (± erro padrão) de parâmetros da ecogeneidade de corpos lúteos (D 5 ao 18) de cabra prenhe e não prenhe, após indução do estro sincronizado com acetato de medroxiprogesterona (MAP, 6 dias), d-cloprostenol e diferentes gonadotrofinas (hCG – 300 UI, eCG – 200 UI ou pFSH – 30 UI), no período de transição sazonal (dezembro, 21°S).

Tabela 6 Média (± erro padrão) de parâmetros de heterogeneidade (Pixels) e vascularização (escore de vascularização e número de pixels coloridos) dos corpos lúteos (D5 a 28) de cabra prenhe e não prenhe no período de transição sazonal (dezembro, 21°S).

O EFEITO DA hCG, eCG E pFSH SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS DO CORPO LÚTEO DE CABRAS APÓS A INDUÇÃO DO ESTRO SINCRONIZADO

RESUMO - O presente estudo testou a hipótese de que a hCG e pFSH estimulam o desenvolvimento folicular e de corpos lúteos, equivalente aos induzidos pela eCG em fêmeas caprinas. Cento e quinze cabras Toggenburg foram divididas e submetidas ao protocolo de curta duração (60 mg MAP, 6 dias; Dia - 8) durante o período sazonal de transição. Cada grupo recebeu 24 hs antes da remoção da esponja 22.5 µg d – cloprostenol e 200 UI eCG, ou 300 UI hCG ou 30 UI pFSH. A dinâmica folicular (n = 85 cabras) foi realizada desde o momento da aplicação da gonadotrofina (Dia – 3) até a detecção da ovulação. O início do estro (Dia 0) foi monitorada para avalição do comportamento estral. As variáveis biométricas e vasculares do corpo lúteo (CL: área, diâmetro, volume, ecogeneidade, heterogeneidade, escore de vascularização e número de pixels coloridos) entre cabras prenhes e não prenhes foram avaliadas em momentos específicos (Dia 5, 8, 13, 18, 23 e 28) pela ultrassonografia bidimensional (Modo B) e Doppler Colorido. O diagnóstico de gestação foi confirmado pela detecção da vesícula embrionária, realizada sobre o Dia 28. O diâmetro do maior folículo no dia da aplicação da gonadotrofina e o tempo para o alcance do diâmetro máximo do folículo dominante foi maior e mais precoce no grupo eCG (P = 0,024 e P = 0,002; respectivamente). Cabras tratadas com eCG e pFSH apresentaram maiores dimensões foliculares (P = 0,003) e hCG, maior número de folículos ovulatórios (P = 0,004) e corpos lúteos (P = 0,0001). A ovulação ocorreu mais rápida no grupo eCG, mas todos os grupos apresentaram tempo similar entre o início do estro e ovulação (P = 0,048). Corpos lúteos de cabras prenhes do grupo hCG apresentaram diâmetro (P = 0,043) e volume (P = 0,046) menores sobre o Dia 18 (P = 0,001). A ecogeneidade do CL de cabras prenhes foi alta em todos os grupos sobre o Dia 28, comparado as avaliações iniciais (Dia 5 e 8) e baixa em CL de cabras não prenhes a partir do Dia 18 (P = 0,001). A heterogeneidade e vascularização do CL de cabras prenhes e não prenhes não foi influenciada pela interação entre tratamentos e dia da avaliação (P > 0,05). Mas independente do tratamento, CLs de cabras prenhes apresentaram maior heterogeneidade e maior área de vascularização ao longo dos dias de avaliação (P = 0,001). Ao contrário, CLs de cabras não prenhes mostraram redução dos valores de vascularização e heterogeneidade a partir do Dia 18 e 23, respectivamente (P < 0,001). A taxa de concepção média foi de 65,76 % e taxa de de prenhez equivalente a 62,72 %, não diferindo entre os grupos experimentais. A hCG e pFSH são equivalentes à eCG na indução da resposta ao estro, na taxa de ovulação, concepção e prenhez, entretanto há diferenças na dinâmica folicular e luteal. O curto intervalo de tempo entre a remoção da esponja e ovulação observado no grupo eCG, provavelmente está relacionada ao maior diâmetro do maior folículo no dia da aplicação da gonadotrofina. Desta forma, diferenças encontradas nas dimensões foliculares entre os grupos não estão exclusivamente relacionadas ao tipo de gonadotrofina, mas com o status folicular no momento da administração da gonadotrofina. Independente, hCG e pFSH foram capazes de promover o

desenvolvimento folicular adequado, visto que o diâmetro do maior folículo ovulatório foram similares de cabras tratadas com eCG. Quanto as diferenças encontradas nas características biométricas e ecogênicas dos CLs, estas devem-se a maior capacidade ovulatória da hCG, que por sua vez resultaram em CLs de menor diâmetro e volume e maior valor de pixel de ecogeneidade. No entanto, estes achados não se rementem a uma anormalidade, desde que as mudanças morfológicas do CL ao longo dos dias das avaliações foram evidenciadas entre os grupos e as alterações vasculares foram distintas apenas com relação a categoria do CL (prenhe e não prenhe).

Palavras-chave: Doppler Colorido, Ecogeneidade, Heterogeneidade, Ultrassonografia

THE EFFECT OF hCG, eCG AND pFSH ABOUT THE MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE GOAT CORPORA LUTEA AFTER THE INDUCTION OF THE SYNCHRONIZED ESTRUS

ABSTRACT – The present study tested the hypothesis that hCG and pFSH stimulate follicular and corpora lutea growth, equivalent to those induced by the eCG in goat females. Toggenburg goats (n = 115) were divided and submitted to the short duration protocol (60 mg MAP, 6 days; Day – 8) during the seasonal transition period. Each group received 22.5 µg d – cloprostenol and 200 IU eCG, or 300 IU hCG or 30 UI pFSH, 24 hours before the sponge removal. The follicular dynamics (n = 85 goats) were performed from the moment of the application of gonadotropin (Day - 3) until the detection of ovulation. The onset of estrus (Day 0) was monitored for evaluation of estrus behavior. The biometric and vascular variables of the corpus luteum (CL: area, diameter, volume, ecogeneity, heterogeneity, vascularization score and number of colored pixels) between pregnant and non-pregnant goats were evaluated at specific times (Day 5, 8, 13, 18, 23 and 28) by two-dimensional ultrasound (Mode B) and Color Doppler. The pregnancy diagnosis was confirmed by detection of the embryonic vesicle performed on Day 28. The diameter of the largest follicle on the day of application of gonadotrophin and the time to reach the maximum diameter of the dominant follicle was higher and earlier in the eCG group (P = 0.024 and P = 0.002, respectively). Goats treated with eCG and pFSH presented greater follicular dimensions (P = 0.003) and hCG, greater number of ovulatory follicles (P = 0.004) and corpora lutea (P = 0.0001). Ovulation occurred faster in the eCG group, but all groups showed similar time between the onset of estrus and ovulation (P = 0.048). Luteal bodies of pregnant goats of the hCG group presented smaller diameter (P = 0.043) and volume (P = 0.046) on Day 18 (P = 0.001). The ecogeneity of CL in pregnant goats was high in all groups on Day 28, compared to initial evaluations (Day 5 and 8) and low in CL of non-pregnant goats from Day 18 (P = 0.001). The heterogeneity and vascularization of CL from pregnant and non-pregnant goats was not influenced by the interaction between treatments and day of the evaluation (P> 0.05). However, regardless of the treatment, CLs of pregnant goats showed greater heterogeneity and greater area of vascularization during the evaluation days (P = 0.001). Unlike, CLs from non-pregnant goats showed reduced values of vascularization and heterogeneity from Day 18 and 23, respectively (P <0.001). The mean conception rate was 65.76% and the pregnancy rate was 62.72%, not differing between the experimental groups. hCG and pFSH are equivalent to eCG in inducing estrus response, ovulation rate, conception and pregnancy, however there are differences in follicular and luteal dynamics. The short interval between sponge removal and ovulation observed in the eCG group is probably related to the larger diameter of the largest follicle on the day of gonadotrophin application. Thus, differences in follicular dimensions between groups are not exclusively related to the type of gonadotrophin, but to the follicular status at the time of administration of gonadotrophin. Independent, hCG and pFSH were able to promote adequate follicular development, since the diameter of the largest ovulatory follicle were similar for goats treated with eCG. As for the differences in the biometric and echogenic characteristics of CLs, these are due to the greater ovulatory

capacity of hCG, which in turn resulted in CLs of smaller diameter and volume and higher pixel value of ecogeneity. However, these findings do not reimpose an abnormality, since the morphological changes of CL throughout the days of the evaluations were evidenced between the groups and the vascular alterations were distinct only with respect to CL category (pregnant and not pregnant).

Key-words: Color Doppler, Ecogeneity, Heterogeneity, Ultrasonography

1 INTRODUÇÃO

Cabras são espécies sazonais dependentes das variações anuais do fotoperíodo para se reproduzirem (FATET; PELLICER-RUBIO; LEBOEUF, 2011a). Devido a esta particularidade, a produção de leite e derivados pode sofrer flutuações que podem gerar grandes perdas econômicas (FATET; PELLICER-RUBIO; LEBOEUF, 2011a). Desta forma, o manejo reprodutivo por meio da indução e/ou sincronização do estro torna-se indispensável para que a oferta dos produtos lácteos mantenha-se constante ao longo do ano (ABECIA; FORCADA; GONZÁLEZ-BULNES, 2012).

A sincronização de estro pode ser realizada pelo prolongamento ou encurtamento da fase lútea com o uso respectivamente de progesterona e prostaglandina exógenos (Fatet et al., 2011). Ambos possuem o objetivo de obter o maior número de fêmeas com estro sincronizado entre 24 a 72 h após a remoção da fonte de progesterona/progestágeno ou da aplicação da prostaglandina (FATET; PELLICER-RUBIO; LEBOEUF, 2011a; BALARO et al., 2017b). A associação de gonadotrofinas é recomendada a fim de estimular o crescimento e maturação folicular, e consequentemente, a taxa de ovulação (MENCHACA et al., 2007; COX et al., 2012; ADRIYANTO et al., 2017). O uso é especialmente importante nas fases de anestro e transição sazonal, ou ainda em fêmeas em condição de não ciclicidade (animais em puerpério, lactação e/ou baixo escore de condição corporal) (KAWATE et al., 2002; FONSECA et al., 2005b; ALVARADO-ESPINO et al., 2016).

A gonadotrofina mais utilizada é eCG, no entanto, em razão da possível queda da fertilidade pelo seu uso frequente associado a produção de anticorpos anti-eCG, diferentes gonadotrofinas como hCG e FSH são recomendadas como novas alternativas para indução e sincronização de estro em cabras (ALVARADO-ESPINO et al., 2016; FONSECA et al., 2005; Hervé et al., 2004). Todas estas gonadotrofinas tem garantido altas taxas de respostas ao estro (~ 92.5 %) e desenvolvimento folicular adequado, entretanto, apesar de resultarem em similares taxas de concepção, estas podem variar de 40 a 100 % (FONSECA et al., 2005b, 2017; SOUZA et al., 2011; PIETROSKI et al., 2013).

Esta variação pode ser relacionada a múltiplos fatores, mas, especificamente, para que concepção seja alcançada é indispensável adequado desenvolvimento folicular, ovulação e dinâmica luteal, os quais garantam a produção de oócito(s) com competência fecundante e funcionalidade luteal que proporcionem ambiente uterino favorável ao desenvolvimento e implantação embrionário. Portanto, o sucesso de um protocolo de sincronização é aquele que promove a ovulação de folículos saudáveis e corpos lúteos funcionais capazes de produzirem quantidades adequadas de progesterona (TORTORELLA et al., 2013).

Espera-se que as gonadotrofinas (eCG, FSH e hCG) atuem de forma diferente sobre a atividade ovariana, devido a suas particularidades químicas e farmacocinéticas. A eCG tem dupla atividade (FSH e LH) e meia vida longa (≥ 50 h) (MURPHY, 2012). A hCG tem ação majoritária de LH, e em cabras possui rápida absorção e meia vida longa (~ 39 h, podendo ser até 106 h) (SALEH et al., 2012). Os preparados comerciais de FSH podem variar seu grau de purificação (relação FSH:LH) e tem meia vida curta (~ 10 h), (DE RENSIS et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2014; FONSECA et al., 2017).

Estas diferenças podem refletir na qualidade do folículo/oócito e consequentemente no corpo lúteo (TORTORELLA et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2014), entretanto, ainda há escassez de conhecimentos sobre seus efeitos na dinâmica folicular em fêmeas caprinas (FONSECA et al., 2017) e nenhum estudo sobre a dinâmica luteal de cabras submetidas a sincronização do estro com as diferentes gonadotrofinas, bem como, da relação destes resultados com a concepção.

As gonadotrofinas utilizadas para indução do estro e ovulação podem, direta ou indiretamente, influenciar a qualidade do corpo lúteo em diferentes espécies. Estudos em vacas e ovelhas tem demonstrado que eCG, hCG e FSH podem influenciar o número corpos lúteos e as características morfológica do tecido luteal interferindo de forma positiva sobre a capacidade esteroidôgenica (FÁTIMA et al., 2013; RIGOGLIO et al., 2013; COLESON et al., 2015). A eCG estimula o aumento do número de células luteais grandes e de mitocôndrias do corpo lúteo bovino, bem como estimula diversos fatores de crescimento e angiogênicos; estas características estão associadas a maior síntese esteroidogênica (RIGOGLIO et al., 2013; SOUSA et al., 2016). O FSH induz corpos lúteos de adequada funcionalidade em vacas por aumentar a expressão de

fatores angiogênicos. A hCG, como promotor do crescimento folicular tem-se mostrado adequado, porém as caracteristicas dos corpos lúteos induzidos por estes tratamentos não tem sido relatadas (KAWATE et al., 2002; FONSECA et al., 2005b, 2017; ALVARADO-ESPINO et al., 2016)

Considerando a ausência de estudos em caprinos é de extrema importância identificar características da dinâmica luteal em resposta ao tratamento com diferentes gonadotrofinas nesta espécie para melhoria da eficiência dos protocolos. O presente estudo testou a hipótese de que a hCG e FSH estimulam o desenvolvimento folicular e de corpos lúteos, pelo mesmo, de maneira equivalente aos induzidos pela eCG em fêmeas caprinas. Desta forma, objetivam-se: a) avaliar o efeito da eCG, hCG e FSH sobre a dinâmica folicular de cabras desde o momento da aplicação da gonadotrofina até a ovulação; b) estudar características morfofuncionais de corpos lúteos formados em resposta aos tratamentos; e c) determinar a taxa de concepção de fêmeas com estro sincronizado pelos diferentes protocolos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia Reprodutiva e Estacionalidade

Cabras são espécies poliéstricas estacionais de dia curto, assim, o fator crucial para a retomada da ciclicidade é o decréscimo no número de horas luz por dia (fotoperíodo). Desta forma, a atividade reprodutiva é fortemente influenciada pela latitude, principalmente em cabras localizadas em regiões acima dos trópicos (30°), onde diferenças no comprimento hora/luz entre os dias curtos e longos é mais evidente (URRUTIA-MORALES et al., 2009). Nestes animais a estação reprodutiva pode ser dividida em anestro (início do inverno ao início do verão), transição (verão) e acasalamento (final do verão ao início do inverno; outono) (FONSECA et al., 2005c). Ao contrário, cabras criadas nas proximidades da linha do equador ou em áreas subequatoriais (latitude abaixo de 30°), onde as diferenças de luminosidade são quase imperceptíveis podem manifestar estro ao longo de todo o ano (FONSECA, 2005; OLIVEIRA, 2010).

A maneira pelo qual a atividade reprodutiva é retomada em espécies fotoperíodo negativa, depende de mecanismos neuroendócrinos. A retina dos olhos capta a variação de luminosidade por meio do núcleo supraquiasmático, localizado no hipotálamo e, transfere estes sinais a glândula pineal, responsável em produzir melatonina (SENGER, 2005). Este hormônio é sintetizado exclusivamente durante a noite e secretado na corrente sanguínea e no líquido cefalorraquidiano (SCHLLO, 2009). A melatonina age no controle da liberação do GnRH, que por sua vez influenciam a liberação de hormônios gonadotróficos como FSH e LH (SENGER, 2005). Assim, quando o período de luminosidade diário é baixo, a glândula pineal eleva a produção de melatonina, consequentemente, isto resulta no aumento dos pulsos e da frequência da liberação dos hormônios gonadotróficos e o retorno da atividade cíclica (SENGER, 2005).

Vários fatores podem influenciar a atividade reprodutiva além da latitude, como por exemplo a nutrição, fêmeas submetidas a dietas com alto teor de proteína (17,3 ± 7,5 %) permanecem mais tempo cíclicas comparadas com cabras que consomem dietas com baixo percentual de proteína (6,2 ± 0,7 %) (URRUTIA-MORALES et al.,

2009). Outro fator que tem sido intensamente estudado na espécie caprina, é o “efeito macho”. A presença de um macho sexualmente ativo pode aumentar a frequência de pulsos de LH e estimular a atividade ovariana da fêmea (CHASLES et al., 2018). A presença de um reprodutor de alto libido durante 4 horas diárias por 15 dias foi capaz de induzir a ovulação em cabras em anestro (BEDOS et al., 2010). Ademais, estudos mostram que o contato contínuo com um macho sexualmente ativo pode antecipar a puberdade (CHASLES et al., 2018) e prevenir o anestro em cabras (DELGADILLO et al., 2015).

2.1.1 Ciclo Ovariano

O ciclo ovariano refere-se as alterações estruturais e hormonais em consequência do crescimento do folículo, ovulação, formação do corpo lúteo e regressão do corpo lúteo (SCHILLO, 2009). O período no qual um folículo se desenvolve até o estágio ovulatório é denominado de fase folicular e ação hormonal predominante é o estradiol. Durante esta fase do ciclo, o corpo lúteo regride e a principal estrutura em evidência é o folículo ovulatório. Em seguida, com o advento da ovulação, inicia-se a fase luteal, caracterizada pela formação do corpo lúteo estrutura dominante nos ovários neste período e responsável pela síntese de progesterona (SCHILLO, 2009).

2.1.1.1 Fase Folicular

O desenvolvimento folicular em cabras ocorre em um padrão de ondas (GINTHER; KOT, 1994). Uma onda folicular refere-se a emergência de um grupo de folículos pré-antrais pequenos (cerca de um ou dois folículos) que são selecionados para crescerem mais que 5 mm de diâmetro (RUBIANES; MENCHACA, 2003). De acordo com diferentes autores, cabras desenvolvem cerca de 3 a 4 ondas ao longo do ciclo, em média 21 dias (GINTHER; KOT, 1994; CASTRO et al., 1999; MEDAN et al., 2003; RUBIANES; MENCHACA, 2003).

A Onda 1 é definida como a primeira onda após ovulação e sua emergência em cabras com padrão de quatro ondas ocorre em média sobre o Dia - 2 (Dia 0 = dia da ovulação); enquanto a Onda 2 sobre o Dia 2 a 5; Onda 3 no Dia 6 a 9 e Onda 4 sobre o Dia 10 a 15, totalizando um intervalo interovulatório de 21 dias (GINTHER;

KOT, 1994; MEDAN et al., 2003). Segundo Menchaca e Rubianes (2002), o fator responsável em induzir o desenvolvimento de 3 ou 4 ondas em um animal é a progesterona, isto porquê, o aumento da concentração de progesterona no início da fase luteal, acelera o tempo para o alcance do diâmetro máximo dos folículos da Onda 1 e antecede a Onda 2, o que permite que um animal desenvolva quatro ondas foliculares em um ciclo.

Ao contrário, animais de três ondas apresentam intervalo mais prolongado da Onda 1 e 2 e concentrações de progesterona mais baixa em relação as cabras com quatro ondas entre os Dia 1 a 5 pós – ovulação (média de 2,2 ± 1,1 ng/mL e 4,1 ± 0,7 ng/mL, respectivamente, $P \leq 0,05$) (MENCHACA; RUBIANES, 2002). Assim, animais que apresentam altas concentrações de progesterona pós-ovulação, tem maior probabilidade de desenvolverem um padrão de quatro ondas, pois a viabilidade dos folículos da primeira onda é afetada pela concentração deste hormônio (MENCHACA; RUBIANES, 2002).

Outra importante interação da progesterona em relação a dinâmica folicular é sua influência sobre o diâmetro máximo dos folículos dominante (RUBIANES; MENCHACA, 2003). Grandes folículos foram observados principalmente sobre a primeira e última onda folicular (folículo ovulatório); período no qual a concentração de progesterona encontram-se mais baixa em consequência da imaturidade do corpo lúteo ou de sua luteólise (CASTRO et al., 1999; NOGUEIRA et al., 2015). Baixo limiar de progesterona ao final do ciclo é fundamental para desencadear a liberação dos pulsos de LH (MENCHACA; RUBIANES, 2002; NOGUEIRA et al., 2015). Assim, o maior diâmetro dos folículos na Onda 1 e ovulatória se deve ao fato que a redução da concentração de progesterona induz um feedback positivo para liberação do LH e consequentemente proporcione o crescimento final dos folículos (MENCHACA; RUBIANES, 2002). Ao contrário, altas concentração de progesterona como as encontradas durante a fase média luteal (Dia 13), bloqueiam o crescimento e ovulação dos folículos da segunda e terceira onda, o que os tornam folículos relativamente menores em relação aos encontrados na primeira e última onda ovulatória (MENCHACA; RUBIANES, 2002; RUBIANES; MENCHACA, 2003).

Cada onda folicular é precedida pela elevação transitória de FSH, que posteriormente declina durante o crescimento folicular em decorrência do aumento do

estradiol e inibina A (MEDAN et al., 2003). Um pico de estradiol 17 β (30,9 ± 1,0 pg/mL) ocorre 2 dias prévios a ovulação e continua relativamente alto quatro dias pós - ovulação (1,9 ± 0,1 pg/mL), mas declinam a níveis basais durante a fase luteal (MEDAN et al., 2003). O aumento da concentração de estradiol após a ovulação é decorrente o desenvolvimento dos folículos dominantes da Onda 1 (MEDAN et al., 2003).

A taxa de crescimento folicular não difere-se de uma onda para outra, em média os folículos desenvolvem-se em uma taxa média de 1 mm/dia (GINTHER; KOT, 1994; MEDAN et al., 2003). Em compensação, o diâmetro máximo dos folículos dominantes varia conforme a onda, sendo maior na onda ovulatória, em média de 7,2 ± 0,2 mm ($P < 0,05$) (GINTHER; KOT, 1994; CASTRO et al., 1999; FONSECA et al., 2017).

A dominância folicular foi por muitos anos defendida por alguns autores (GINTHER; KOT, 1994; CASTRO et al., 1999) e contrariada por outros (MEDAN et al., 2003). No entanto, atualmente a dominância folicular é aceita e diante das contradições passadas o termo “co-dominância” tem sido utilizada (RUBIANES; MENCHACA, 2003). Isto porquê, o padrão de “dominância” observado na espécie bovina não se enquadra com a relatada em cabras (CUETO et al., 2006).

Em bovinos, o folículo dominante desempenha papel inibitório sobre o crescimento dos folículos subordinados e na emergência folicular. Isto parece não ocorrer na espécie caprina, o folículo dominante exerce efeito inibitórios sobre os folículos menores da mesma onda, porém não interfere na emergência folicular da próxima onda (CUETO et al., 2006). Visto que, ovulações múltiplas podem ocorrer nos dois ovários ou até posterior as primeiras ovulações em cabras (MENCHACA; RUBIANES, 2002). Segundo Nogueira et al. (2015), cerca de 61,5% (8/13) das ovulações em cabras ocorrem de folículos de uma única onda e um mesmo ovário, mas 38,5% (5/13) das múltiplas ovulações podem ocorrer de uma única onda em diferentes ovários e ainda 7,1% (1/14) de ondas foliculares diferentes.

2.1.1.2 Fase Folicular no Período de Anestro

O anestro é caracterizado pela ausência das manifestações comportamentais de estro e ovulações, porém o desenvolvimento folicular é mantido (BARTLEWSKI et al., 1998). Tendo em vista que, o cessamento das ovulações e a retomada da

ciclicidade ocorrem de forma gradual, o anestro pode ser divido em dois períodos de transição (estro para anestro e anestro para estro).

O período de transição estro para anestro é marcado pela redução da liberação dos pulsos de LH e pela baixa sensibilidade dos ovários as gonadotrofinas (FSH e LH) que resultam na redução da concentração sérica de estradiol e progesterona (BARTLEWSKI; BEARD; RAWLINGS, 1999a). Estudos em ovelhas, mostram que o crescimento folicular perpetua em um padrão de onda, porém a emergência das ondas não são acompanhadas pelo pico de FSH (BARTLEWSKI; BEARD; RAWLINGS, 1999a). Além disso, a taxa de crescimento folicular reduz a medida que o anestro se aproxima, mas volta a aumentar ao final do anestro (BARTLEWSKI; BEARD; RAWLINGS, 1999a, 1999b). O que também ocorre em cabras, segundo Nogueira et al. (2015), a taxa de crescimento folicular, o diâmetro máximo dos folículos dominantes e a presença de co-dominância são maiores na estação reprodutiva comparada com o anestro sazonal (0,81 ± 0,05 mm/dia versus 0,61 ± 0,05 mm dia e 7,8 ± 0,1 mm versus 6,7 ± 0,1 mm; respectivamente), o autor sugere que tais diferenças possam ser relacionado ao inapropriado suporte de LH durante o anestro.

Já o período de transição anestro para o início do estro é caracterizado pelo aumento da concentração de progesterona pela luteinização dos folículos em consequência do aumento da frequência dos pulsos de LH, mas não presença do corpo lúteo (BARTLEWSKI; BEARD; RAWLINGS, 1999b). As flutuações do FSH são acompanhadas pela emergência de folículos pré-antrais e o níveis de estradiol são restaurados (BARTLEWSKI; BEARD; RAWLINGS, 1999b). As primeiras ovulações são caracterizadas por corpos lúteos de dimensões reduzidas, baixa concentração sérica de progesterona e menor percentual de ovulações (BARTLEWSKI; BEARD; RAWLINGS, 1999b).

2.1.2.1 Fase Luteal

A fase luteal do ciclo ovariano é definido pelo intervalo entre a ovulação e a regressão do corpo lúteo (SCHILLO, 2009). Várias modificações celulares e bioquímicas ocorrem durante esta fase para transformar um folículo ovulatório no corpo lúteo.

2.1.2.2 Luteinização

A luteinização é processo de diferenciação terminal que culmina com a transformação das células da granulosa em células luteais do corpo lúteo (STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007). Esta etapa inicia-se antes da ovulação apesar das modificações mais intensas ocorrerem após a ruptura do folículo ovulatório (STOUFFER, 2015). A onda ovulatório de LH promove inicialmente o bloqueio da proliferação celular e posteriormente a diferenciação de enzimas esteroidogênicas das células da granulosa que antes tinham como papel principal a produção de estradiol para a produção de progestorona (RICHARDS et al., ; STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007).

A proliferação celular é estimulada pelas proteínas ciclinas tipo D-1 e 2 que se ligam e ativam as quinases dependentes de ciclinas 4/6 (Cdks 4/6) (RICHARDS et al., 1998) e é interrompida pelas ciclinas inibitórias p21 e p27 (ROBKER; RICHARDS, 1998). A ativação deste complexo entre ciclinas e Cdks estimulatórias resultam na fosforilação de fatores de transcrição que levam a síntese de DNA e progressão celular da fase G1 para S do ciclo celular (interfase) e assim, a proliferação das células da granulosa (ROBKER; RICHARDS, 1998; STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007). Ao contrário, o aumento da expessão das moléculas p21 e p27 resultam no bloqueio do ciclo celular (ROBKER; RICHARDS, 1998).

A onda ovulatório do LH funciona como um estímulo para o aumento da expressão da p21 e p27 e do bloqueio da proliferação das células da granulosa de forma irreversível (ROBKER; RICHARDS, 1998). Vários componentes da matriz extracelular (MEC) e fatores de transcrição contribuem para este processo e vem sendo esclarecidos atualmente. Estudos em cabras mostram a participação dos inibidores da matriz de metaloproteinases tipo 3 (TIMP-3) e de proteínas da MEC no bloqueio da ciclo celular e na biossíntese de enzimas esteroidogênicas (PENG et al., 2015a, 2016).

A TIMP-3 é encontrada nas células da granulosa, teca e no corpo lúteo, sua expressão aumenta com a administração de doses luteinizantes de LH/hCG (1UI/L) durante o cultivo *in vitro* (PENG et al., 2015a). A participação da TIMP-3 na proliferação do ciclo celular tem sido ligada ao fato de que esta enzima quando superexpressa induz a apoptose das células da granulosa (PENG et al., 2015a). O

mecanismo pelo qual TIMP-3 induz apoptose parece ter envolvimento das proteínas da MEC como a decorina, isto porque a TIMP-3 regula a expressão da decorina (PENG et al., 2015a). E a superexpressão de decorina desencadeia a apoptose e bloqueio da proliferação via p-21 das células da granulosa em cabras (PENG et al., 2015a, 2016).

A interrupção da proliferação das células foliculares resulta em um novo painel de receptores (STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007). A onda de LH induz silenciamento do do receptor de FSH e aumento da expressão de receptores de LH e prolactina (STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007). Outro importante evento durante a luteinização é o aumento da expressão proteínas regulatórias e de enzimas da síntese de progesterona tais como STARs (proteína regulatória aguda esteroidogênica), 3βHSD (3β-hidroxiesteroide desidrogenase), $P450_{scc}$ e da redução da expressão da enzima $P450_{\text{-aromatase}}$ (STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007; SUGINO, 2014).

A redução da $P450_{\text{-aromatase}}$ é fundamental para facilitar a produção de progesterona, visto que essa enzima é responsável em converter a androstenediona em estradiol (SUGINO, 2014). Em cabras aquisição das enzimas esteroidogênicas parece ter o envolvimento da TIMP-3 e dos fatores de transcrição como a RUNX 1 e RUNX 2 (PENG et al., 2015a; GAO et al., 2018). Isto porquê, o silenciamento destes genes resultam em baixa concentração de progesterona e da expressão de enzimas chaves tais como STARs, 3βHSD e da $P450_{scc}$ (PENG et al., 2015b; GAO et al., 2018).

Estas são algumas das alterações moleculares relatadas atualmente envolvidas na interrupção do ciclo celular do folículo ovulatório e na transformação das células da granulosa e da teca interna em luteais grandes e pequenas, respectivamente (SCHILLO, 2009). Desta forma, é condizente mencionar que o corpo lúteo é resultado de um processo contínuo de maturação folicular (SMITH; MCINTUSH; SMITH, 1994). Esta interação é importante de ser ressaltada, visto que o tamanho do folículo pode influenciar o tamanho do corpo lúteo (ARIKAN; YIGIT, 2003). Espera-se que grandes folículos resultem em corpos lúteos de maiores dimensões e maior capacidade de síntese esteroidogênica. Esta tipo de relação tem sido fortemente comprovada em bovinos e bubalinos (SÁ FILHO et al., 2010; TORTORELLA et al., 2013; PANDEY et al., 2018).

Entretanto, em pequenos ruminantes, esta correlação entre diâmetro folicular e luteal parece variar com a taxa ovulatória (3 corpos lúteos/ciclo) (O'SHEA; RODGERS; WRIGHT, 1984; BARTLEWSKI; BEARD; RAWLINGS, 1999c; DIAS et al., 2018). Isto porquê, o aumento da resposta ovulatória frequentemente leva o desenvolvimento de folículos e corpos lúteos de menores dimensões e síntese de progesterona (BARTLEWSKI; BEARD; RAWLINGS, 1999c; DIAS et al., 2018). Fatores como a ovulação de folículos ainda imaturos ou baixa proporção de células esteroidogênicas decorrente de folículos ovulatórios pequenos têm sido sugeridos como fatores responsáveis pela inadequada função luteal (BARTLEWSKI; BEARD; RAWLINGS, 1999c; DIAS et al., 2018). Assim é preferível que a ovulação ocorra de folículos com maiores dimensões, pois há maior probabilidade de terem alcançado maturidade suficiente para se desenvolverem em corpos lúteos funcionais (DIAS et al., 2018), ou por simplesmente resultarem em maior número de células luteais sem aumentar o número de folículos recrutados (ADRIYANTO et al., 2017).

2.1.2.3 Corpo Lúteo

O corpo lúteo é um órgão transitório, responsável pela produção de progesterona e desempenha importante papel na regulação do ciclo estral por estimular o crescimento folicular e a manutenção da gestação. A presença de um corpo lúteo funcional é fundamental para os processos de implantação, placentação e crescimento do concepto (SATTERFIELD; BAZER; SPENCER, 2006; SPENCER; FORDE; LONERGAN, 2015). Visto que, concentrações adequada de progesterona estimulam o alongamento do embrião e consequentemente o reconhecimento materno, além de promover alterações endometriais para tornar o útero um ambiente favorável para o estabelecimento da gestação (SATTERFIELD; BAZER; SPENCER, 2006; SPENCER; FORDE; LONERGAN, 2015).

O corpo lúteo é composto principalmente de células luteais grandes e pequenas, mas também por células não esteroidogênicas, como as células endoteliais/pericitos, fibroblastos e células imunes (O'SHEA; RODGERS; WRIGHT, 1986). Estas células têm diferentes fatores morfológicas, endócrinos e bioquímicas. Interação entre estes vários tipos de células e essencial para manter a funcionalidade do corpo lúteo (STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007).

2.1.2.4 Desenvolvimento e Regressão do Corpo Lúteo

Após a ovulação ocorre um rearranjo das paredes dos folículos para facilitar a infiltração das células fibroblásticas, endoteliais e da teca interna para região central do folículo recém rompido (O'SHEA; CRAN; HAY, 1980). Este remodelamento estrutural e celular é facilitado pela quebra da membrana basal que separa a camada avascular das células da granulosa para a camada interna da teca e também é fundamental para o neovascularização do corpo lúteo recém formado (O'SHEA; CRAN; HAY, 1980; STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007).

A densidade celular e vascular altera ao longo do desenvolvimento do corpo lúteo. As células luteais ocupam cerca de 55 % do tecido luteal, sendo que, a proporção de células luteais grandes e pequenas é de 36 a 19 %, respectivamente (FARIN et al., 1986). Durante a fase inicial (Dia 4) há um aumento expressivo do número de células luteais pequena e da densidade vascular que aumentam para acima de 20 % na fase intermediária (Dia 12) (FARIN et al., 1986; MIRANDA-MOURA et al., 2010). O volume das células luteais pequenas é constante, enquanto que, nas células luteais grandes aumentam progressivamente do Dia 4 para o Dia 16, é possível afirmar que células luteais pequenas aumentam em número e células luteais grandes no volume (FARIN et al., 1986). Estudos indicam que esta diferença está ligada a baixa capacidade de mitose pós-ovulatória das células luteais grandes, comparada com as células pequenas (MCCLELLAN et al., 1975; O'SHEA; CRAN; HAY, 1980).

A maturidade do corpo lúteo é alcançada ao redor do Dia 12 e é caracterizada pela presença de núcleo centralizado, grande e esférico contendo grânulos no citoplasma das células luteais (MIRANDA-MOURA et al., 2010). A atividade secretória de progesterona é maior neste período, tendo em vista que, estudos histológicos mostram o aumento do número e volume mitocondrial de 103 (Dia 4), 423 (Dia 14) e para 480 (Dia 16) nas células luteais de cabras (JIANG et al., 2016), momento este que coincide com o pico máximo da concentração sérica de progesterona (Dia 14) na espécie (BALARO et al., 2017a). A taxa metabólica basal de progesterona diferencia com relação aos tipos de células luteais, sendo cerca de 2 a 40 vezes maior nas células luteais grandes em comparação com as células luteais pequenas (STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007).

A síntese de progesterona nas células luteais é mediada pela subunidade catalíticas PKA, estas ativam as proteínas STARs para captar o coleterol na forma de HDL para a mitocôndria (WILTBANK et al., 2012). Na mitocôndira a enzima esteroigênica CYP450 cliva o colesterol em pregnenolona, em seguida outra enzima, a 3 βHSD converte a pregnenolona em progesterona (WILTBANK et al., 2012). Importante ressaltar que a elevação da atividade metabólica do corpo lúteo em consequência da produção da progesterona é acompanhado pelo aumento da rede vascular, mediado por vários fatores angiogênicos como o VEGF A (fator de crescimento endotélio vascular), FGF 1 e 2 (fator de crescimento fibroblástico 1 e 2), IGF1 e 2 (fator de crescimento insulina tipo 1 e 2) e ANPT- 1 e 2 (angiopoentina) (SCHAMS; BERISHA, 2004; WILTBANK et al., 2012). Um fluxo de sangue adequado para o corpo lúteo é indispensável neste momento não somente para entrega de progesterona na circulação periférica, mas também para o resgate de nutrientes, hormônios e substratos para o corpo lúteo (MEIDAN et al., 2005).

A concentração de progesterona aumenta continuamente até o completo desenvolvimento do corpo lúteo e declina com o início da luteólise (ARASHIRO et al., 2010b; BALARO et al., 2017a). A progesterona começa a aumentar logo após a ovulação, mas atinge valores máximos sobre o Dia 14 (ARASHIRO et al., 2010a; BALARO et al., 2017a). Enquanto, a luteólise é marcada pela queda abrupta da progesterona a níveis basais (< 1 ng/mL), dentro de 24 horas (BALARO et al., 2017a).

Alguns fatores como número de corpos lúteos e a raça podem influenciar a concentração de progesterona (FONSECA; TORRES, 2005; BALARO et al., 2017a). Segundo Balaro et al. (2017a), cabras da raça Saanen que continham dois ou três corpos lúteos apresentaram maior concentração de progesterona, comparada com cabras de uma única ovulação (10,3 ± 5,7 versus 8,8 ± 4,8 ng/mL; respectivamente). Esta diferença parece não ocorrer em cabras da raça Toggenburg, pois a concentração plasmática de progesterona entre fêmeas multiovulatórias versus monovulatórias foram similares (5,98 ± 0,59 ng/mL versus 7,04 ± 0,79 ng/mL; $P > 0,05$) (ARASHIRO et al., 2010c).

Em bovinos, o tamanho do corpo lúteo influencia a concentração de progesterona, visto que, corpos lúteos normais apresentam maior área luteal e maior concentração de progesterona com relação a corpos lúteos anormais (regressão

prematura) (VRISMAN et al., 2017). Este tipo de correlação também tem sido detectado em pequenos ruminantes, corpos lúteos funcionais são caracterizados por maiores dimensões (diâmetro) (CAMP et al., 1983), peso, maior número de células luteais e maior capacidade de síntese esteroidogênica (O'SHEA; RODGERS; WRIGHT, 1984).

Recentes estudos também mostram um forte correlação entre o tamanho do corpo lúteo e a concentração de progesterona (ADRIYANTO et al., 2017; BALARO et al., 2017a), entretanto, esta relação tem sido controversa quanto o tipo ovulação (natural ou induzida) tem sido avaliada. Segundo Vázquez et al., (2010), a sincronização do estro em cabras com duas doses de PGF2α natural (263 µg; intervalo de 10 dias), resultaram em corpos lúteos de maior diâmetro, no entanto, a concentração de progesterona nestas fêmeas foram significativamente inferiores de cabras de estro natural.

O tempo de vida útil do corpo lúteo é controlado pela *interferon-tau,* um produto secretado pelas células do trofoectoderma do concepto durante o alongamento do embrião, cuja função é inibir a expressão dos receptores de ocitocina e estrógeno no endométrio uterino, devido sua ação anti-luteolítica (SPENCER; FORDE; LONERGAN, 2015). Entretanto, na ausência deste sinal, uma cascata de reação mediada pela prostaglandina induz o início da regressão do corpo lúteo (PATE; JOHNSON-LARSON; OTTOBRE, 2012). O início da regressão em cabras tem sido relatada sobre o Dia 14 e 16 com base nos achados histológicos (MIRANDA-MOURA et al., 2010; JIANG et al., 2016). Este período é marcado por intensa redução da população celular e na morfologia. As células luteais começam a apresentar núcleo piquinótico e retração do citoplasma (MIRANDA-MOURA et al., 2010), apoptose e autofagia também são observados (JIANG et al., 2016). Em geral uma redução de cerca de 50 % da população celular total e de 70 % da densidade vascular (nº de vasos por área cm^2) tem sido demonstrada (FARIN et al., 1986; MIRANDA-MOURA et al., 2010; JIANG et al., 2016).

2.1.3 Ciclo Estral

O ciclo estral consiste de todas as alterações morfológicas e fisiológicos que ocorrem no ovários e do trato reprodutivo que resultam na expressão do cio (fase de

receptividade sexual) ovulação, cópula e manutenção (FATET; PELLICER-RUBIO; LEBOEUF, 2011b). A duração média do ciclo estral na espécie caprina é de 21 dias, mas pode variar entre 17 a 25 dias (BARIL et al., 1996; MEDAN et al., 2005). Ciclos estrais curtos (< 17 dias) podem estar associados a regressão prematura do corpo lúteo ou anovulação geralmente ocorrem durante o período de transição anestro para estro ou estro para anestro (JAINUDEEN et al., 2004).

2.1.3.1 Características Comportamentais

O reconhecimento das características comportamentais sexuais em diversas espécies de animais domésticos é de extrema importância, visto que, a identificação do início e fim do estro pode aumentar a eficiência de biotécnicas reprodutivas como inseminação artificial. Além disso, a interação social tanto da cabra e do bode, influenciam os parâmetros reprodutivos como o início do cio, duração do cio e ovulação.

A fêmea primeiramente atrai o macho ativamente pelos comportamentos preceptivos, antes de tornarem-se receptivas a cópula (OKADA; TAKEUCHI; MORI, 1998). As características comportamentais indicativas de estro em cabras incluem a agitação da cauda, vocalização constantes, cabeça voltada em direção ao macho, lordose e imobilidade durante a cópula (OLIVEIRA, 2010). Estes sinais aparecem e desaparecem progressivamente com o início e o fim do comportamento de estro (OLIVEIRA, 2010). O término do cio na fêmea é caracterizada pela fuga, cauda baixa e sinais de passividade na presença do reprodutor (OLIVEIRA, 2010). Comportamento homossexual entre fêmeas no cio também são detectados, sendo mais frequentes em fêmeas nulíparas comparadas com primíparas e multíparas (OLA; EGBUNIKE, 2004).

Mudanças morfológicas no trato reprodutivo antes, durante e após o cio tem sido observada por alguns autores. A vulva torna-se mais hiperêmica e edemaciada durante o estro, e a coloração e viscosidade da secreção vulvar aumenta progressivamente no início do cio (OLA; EGBUNIKE, 2004). O muco cervical pode ser utilizado para estimar o momento mais adequado para realização da inseminação artificial, tendo em vista que altas taxas de concepção (80 %) foram adquiridas quando cabras foram inseminadas baseadas no aspecto do muco (SIQUEIRA et al., 2009).

O muco cervical é classificado em 5 tipos conforme descrito por Fonseca et al. (2017; Figura 1): cristalino – 1 (muco translúcido); cristalino a estriado – 2 (muco com alguma opacidade); estriado – 3 (presença de estrias no muco cristalino); estriado a caseoso – 4 (muco com estrias aglutinadas) e caseoso – 5 (muco com aparência de massa caseosa). O muco tipo 1 e 2, geralmente são eliminados antes da manifestação do cio, no período de proestro; enquanto que o muco tipo 3 e 4 foram detectados no estro, em torno de 13,9 ± 7.7 horas após o início do cio e 18, 5 ± 7,7 horas prévia a ovulação; momento este considerado adequado para realizada da inseminação artificial. Já a secreção do tipo 5 foram relatados ocorrendo ao final do estro no tempo da ovulação (FONSECA et a., 2017).

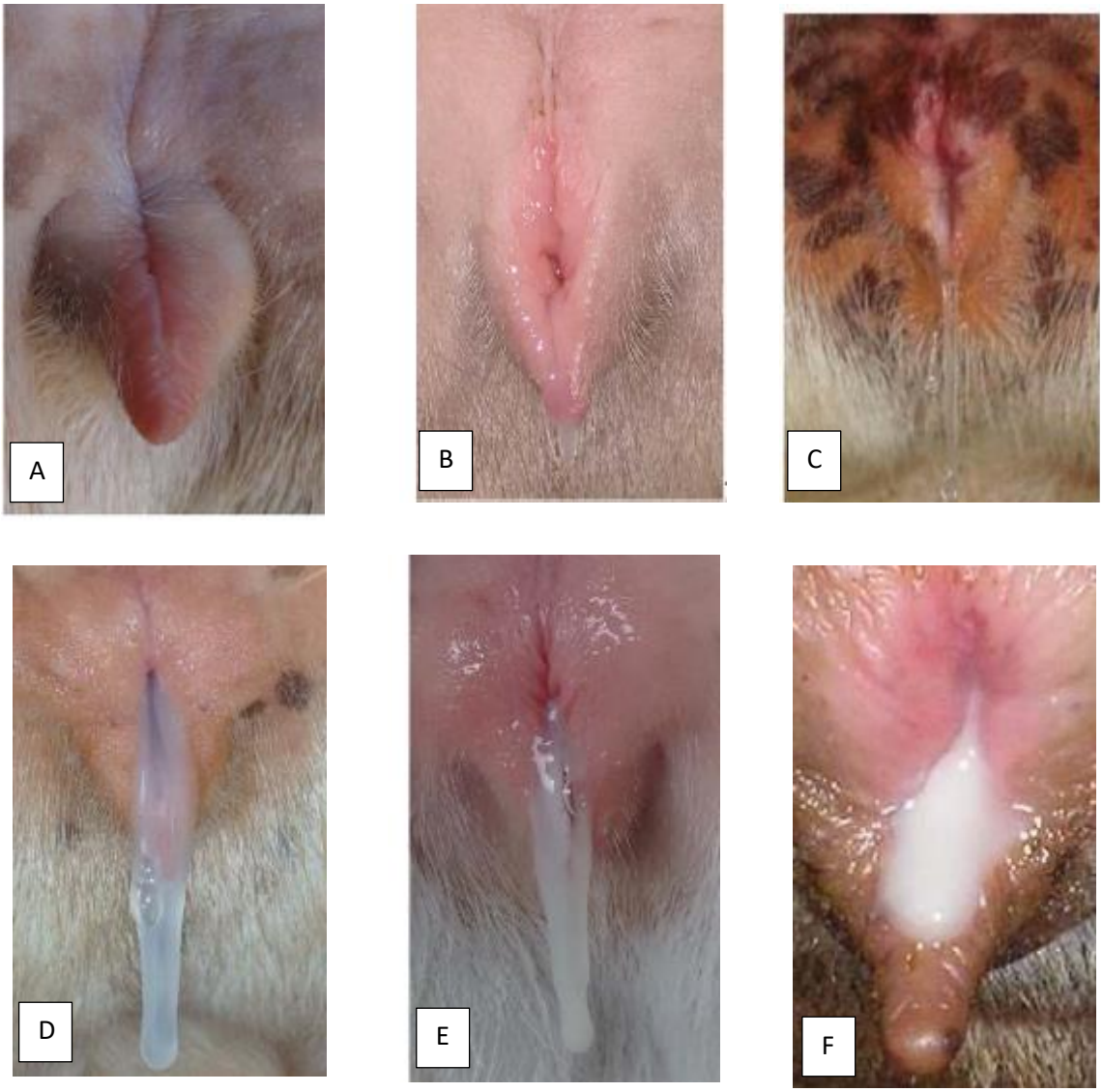

Figura 1 – Características do muco cervical drenado pela vulva na espécie caprina. A) Ausência de secreção mucoide, anestro; B) Tipo 1 – muco cristalino; C) Tipo 2 – muco cristalino a estriado; D) Tipo 3 – muco estriado; E) Tipo 4 – muco estriado a caseoso; F) Tipo 5 – muco estriado caseoso.
Fonte: Fonseca et al. 2017, p. 4.

A duração do estro em média é de 36 horas, mas varia de 24 a 48 horas conforme a idade, variação individual da raça, e presença do macho (FATET; PELLICER-RUBIO; LEBOEUF, 2011b). Em geral, cabras Toggenburg nulíparas submetidas a protocolos de indução e sincronização do estro (MAP – 6 dias) tendem a apresentar estro (29,0 ± 4,4 hs) e ovulação (57,8 ± 9,2 hs) mais precoce que multíparas (47,0 ± 17,9 e 76,7 ± 18,5 hs; respectivamente) (FONSECA et al., 2017). Intervalo de estro curtos (~12 horas) e longos (~ 129 horas) também tem sido

relatados (CHEMINEA et al., 1982; FONSECA et al., 2017). Estas diferenças entre os estudos podem ser associadas as diferentes formas de indução do estro (natural versus induzidos) e status de parição e lactação.

O número e o momento da cópula também afetam a duração do estro e a ovulação em cabras (ROMANO; ALKAR; AMSTALDEN, 2016). Segundo Romano et al. (2016) cabras Boer quando submetidas as duas cópulas sendo a primeira no início de estro e a segunda 4 horas mais tarde, apresentaram redução de cerca de 8 horas do intervalo do estro e ovulação (P = 0,02; P = 0,04; respectivamente) comparada a fêmeas que haviam sido expostas ao macho rufião, onde a cópula não era permitida. A explicação para tal evento está associada ao pico de LH, segundo os autores, apesar da espécie caprina ser considerada de ovulação espontânea, a cópula é capaz de anteceder o pico pré-ovulatório de LH em 7 horas (ROMANO; KEISLER; AMSTALDEN, 2018).

A concentração plasmática de estradiol 17β atinge pico máximo (30,9 ± 1,0 ng/mL) 2 dias prévio a ovulação e se mantem em nível basal durante a maior parte da fase luteal, sofrendo algumas oscilações em razão do crescimento de grandes folículos da primeira e última onda folicular (MEDAN et al., 2003). O aumento da concentração de estradiol 17β desencadeia feedback positivo no eixo hipotalâmico hipofisário resultando na liberação do pico pré-ovulatório de LH, em torno de 3 horas após o pico máximo de estradiol (CHEMINEA et al., 1982). O início do estro geralmente ocorre no tempo da onda ovulatório de LH, cuja duração média é 6,50 ± 0,33 horas; e termina quando a concentração de estradiol declina (OKADA; TAKEUCHI; MORI, 1998).

Estudos mostram que a concentração de estradiol é o fator primordial para a manifestação dos sinais de perceptividade e receptividade em cabras (OKADA; TAKEUCHI; MORI, 1998). Isto porquê, comportamento sexual pode ser estendido em quando altos níveis de estradiol são mantidos após a onda ovulatória de LH em cabras gonadectomizadas (OKADA; TAKEUCHI; MORI, 1998).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Condições Éticas e Experimentais

O experimento foi revisado e aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (protocolo nº 3050060218) e foi conduzido na área rural da cidade de Coronel Pacheco, estado de Minas Gerais, na região sudeste do Brasil (435 m altitude e 21°35''S latitude e 43°15''W longitude), entre os meses de dezembro a fevereiro (período de transição estacional).

Um total de 115 cabras leiteiras da raça Toggenburg (nulípara = 27, primípara = 28, pluríparа = 60) foram divididas em três grupos homogêneos conforme peso (Kg de peso vivo) e escore de condição corporal (1 a 5), respectivamente: (i) eCG (46,39 Kg e 2,71); (ii) hCG (46,12 Kg e 2,65) e (iii) pFSH (46,20 Kg e 2,66). Oitenta e cinco animais (85/115) foram utilizadas para avaliar a dinâmica folicular (eCG: n = 31; pFSH: n = 29 e hCG: n = 25). Quinze cabras (15/115 cabras) foram removidas da avaliação da dinâmica luteal por não ovularem ou por apresentarem regressão prematura do corpo lúteo.

Os animais foram mantidos em condições de manejo intensivo. O volumoso utilizado foi o capim-elefante (*Pennisetum purpureum Schum*) e o concentrado foi constituído por milho, farelos de soja e girassol, balanceado conforme necessidades energéticas de manutenção. Água e suplementação mineral foram disponibilizadas *ad libitum*.

3.2 Protocolos de Indução e Sincronização do Estro

Todas as cabras receberam em um dia aleatório do ciclo estral (Dia - 8) esponja intravaginal impregnada com 60 mg acetato de medroxisprogesterona (MAP; Progespon®, Zoetis; Brasil), por 6 dias (Figura 2). Vinte e quatro horas antes da remoção da esponja (Dia - 3), três grupos foram formados de acordo com a gonadotrofina administrada: (i) eCG (n = 41), 200 UI im (Novormon 5000®, Schering Plough Animal Health, São Paulo, Brasil); (ii) pFSH (n = 40), 30 UI im (Pluset®, Hertape-Calier, São Paulo, Brasil); (iii) hCG (n = 34), 300 UI im (Vetecor®, Hertape-Calier, São Paulo, Brasil). Concomitantemente a aplicação das gonadotrofinas, as

fêmeas receberam uma dose de 22,5 µg (0,4 mL) d-cloprostenol latero vulvar (Prolise®; ARS-S. R. L, Buenos Aires, Argentina).

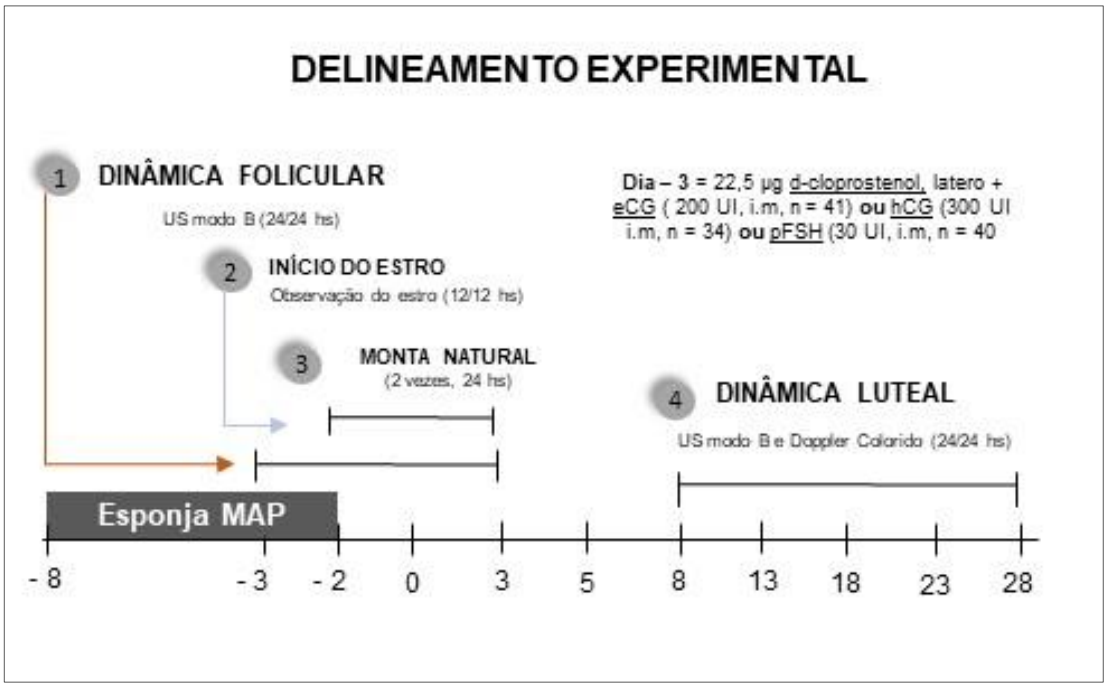

Figura 2 - Representação esquemática dos protocolos de indução e sincronização do estro de cabras leiteiras Toggenburg, durante o período de transição sazonal, com acetato de medroxiprogesterona (MAP, 6 dias), d-cloprostenol e diferentes gonadotrofinas, assim como as avaliações ultrassonográficas (US) realizadas.

3.3 Comportamento Estral e Acasalamento

A observação do estro iniciou-se 12 horas após a remoção da esponja, duas vezes ao dia (06:30 e 18:00 hs) durante 5 dias (Figura 1) e realizada com um macho de libido comprovada, mas sem permitir que o mesmo completasse o acasalamento. Após a identificação das fêmeas em estro, estas foram submetidas a duas montas naturais controladas, em intervalo de 24 horas, com machos previamente selecionados quanto a libido e características seminais adequadas (relação fêmea:macho 7:1).

3.4 Avaliações Ultrassonográficas

As imagens ultrassonográficas do ovário foram realizadas com aparelho portátil (Modelo - M5, Shenzhen Mindray, China) acoplado a um transdutor de 7,5 MHz, por via transretal. O transdutor foi protegido por um filme plástico e fixado a uma guia rígida para facilitar o manuseio e, melhorar a superfície de contato das estruturas reprodutivas analisadas. Todas as avaliações foram realizadas por um único e experiente técnico, com os animais em posição quadrupedal. O conteúdo fecal foi removido gentilmente e 7 mL de gel foi utilizado como lubrificantes antes da introdução do transdutor. As varreduras foram realizadas em modo-B (ganho de 54% e profundidade de 6 cm) e quando aplicável, foram seguidas pela modalidade Doppler colorido (função CFM com as seguintes configurações: frequência de 4,5 MHz, profundidade de 6,0 cm, ganho colorido de 72%, pulso de frequência de repetição de 0,9 K e filtro de parede de 75 KHz. Imagens em modo-B e Doppler colorido foram salvas e analisadas posteriormente.

3.5 Dinâmica Folicular

Avaliações ultrassonográficas modo bidimensional (modo B) dos ovários foram realizadas a partir da aplicação das gonadotrofinas (Dia - 4) e seguiram por seis dias consecutivos (até Dia 3), a cada 24 horas, a fim de acompanhar a dinâmica folicular ovulatória (Figura 1). Cada ovário foi localizado e o número, diâmetro e posição dos folículos ≥ 3 mm foram registrados. As variáveis determinadas foram: número de folículos presentes, diâmetro do maior folículo e soma do diâmetro total dos folículos, no dia da administração das gonadotrofinas; dia e diâmetro máximo do maior folículo dominante; taxa de crescimento folicular (diferença entre o diâmetro máximo e mínimo do folículo, dividido pela duração do seu crescimento); diâmetro máximo do maior folículo pré-ovulatório e diâmetro médio dos folículos pré-ovulatório. A ovulação foi considerada com base na ausência do folículo pré-ovulatório observado do dia anterior.

3.6 Dinâmica Luteal

A dinâmica ovariana dos corpos lúteos foi acompanhada ao longo de período correspondente a fase luteal sincronizada, em dias específicos, totalizando seis

momentos (Dias 5, 8, 13, 18, 23 e 28, sendo o Dia 0 = dois dias após remoção da esponja, momento correspondente ao início do estro) (Figura 2). No Dia 28 foi realizado diagnóstico de gestação confirmado por meio da visualização da vesícula embrionária.

A ultrassonografia modo-B foi utilizada para detecção e biometria das estruturas lúteas [número de corpos lúteos, diâmetro (mm), volume (mm^3) e área (cm^2)]. Diâmetro e área (tracejado) foram mensurados automaticamente pelo software do ultrassom, enquanto o volume foi calculado pela fórmula: Volume = 4/3 x r^3 x π, onde r (raio) = (altura/2 + largura/2)/2 e valor de π = 3.14159 (Pulley et al., 2012). Cada corpo lúteo foi considerado individualmente. Na presença de corpo lúteo cavitário, a área total foi subtraída pela área da cavidade. Todas as variáveis biométricas dos corpos lúteos foram calculadas para a maior estrutura, para a média e para o somatório de corpos lúteos.

A ecogeneidade heterogeneidade foram avaliadas pelo software Image Pro Plus® (Media, Cybernetcs, Inc., San Diego, CA, USA). Para esta avaliação uma área mínima representativa foi definida de acordo com Arashiro et al (2010) e a ecogenicidade (valor numérico de pixel médio, VNP) e a heterogeneidade (desvio padrão de pixel) foram calculadas.

Para a determinação da área de vascularização de cada corpo lúteo, as imagens Doppler colorido foram manualmente recortadas com auxílio do software Adobe Fireworks®. Foram selecionadas imagens que garantiam a visualização da maior área de vascularização. Por fim, o número de pixels coloridos foi calculado pelo software Image J® (National Institutes of Health, Bethesda, MS, USA), conforme descrito por Balaro et al. (2017). A avaliação subjetiva da vascularização foi realizada por meio de escore, conforme proposto por Arashiro et al., (2018): escore 1 (0 – 25%), escore 2 (26 – 50%), escore 3 (51 – 75%) e escore 4 (76 – 100%).

3.7 Análise Estatística

As variáveis paramétricas foram submetidas a análise de variância (anova) com medidas repetidas no tempo. Quando as variáveis não atendenderam os requisitos de normalidade (teste de Shapiro-wilks) e homocedasticidade (teste de levene) foi utilizado o teste de kruskall-wallis. Brevemente, foram incluidos no modelo o efeito do tratamento (gonadotrofina), e quando pertinente, o dia de avaliação e a interação dos

fatores e a identificação das cabras foram usadas como fator aleatório, o teste de Tukey foi utilizado para comparação das médias. As variáveis binominais (resposta ao estro e taxa de concepção) foram comparadas usando o teste de qui-quadrado. Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05. Todas as análises foram feitas com o auxílio do software R.

4 RESULTADOS

4.1 Dinâmica Folicular

A Tabela 1. sumariza os valores encontrados referentes aos parâmetros de dinâmica folicular de cabras submetidas a indução do estro com diferentes tipos de gonadotrofinas. O número total de folículos observados no momento da aplicação das gonadotrofinas foi semelhante entre os grupos experimentais, com média de 4,90 ± 0,32 folículos por cabra (P = 0,699). O diâmetro do maior folículo no dia da administração das gonadotrofinas foi maior em cabras que receberam a eCG, quando comparado com aquelas tratadas com hCG (P = 0,024). O diâmetro máximo do folículo dominante foi similar em todas as fêmeas (P = 0,137), enquanto o tempo médio para os folículos dominantes alcançarem seus diâmetros máximos foi mais curto no grupo eCG, seguido pelo grupo pFSH e mais longo no grupo hCG (P = 0,002).

Maior número de folículos ovulatórios foram observados nos grupos eCG e hCG, quando comparado com o grupo pFSH (P = 0,004; Tabela 1). O diâmetro médio ovulatório dos folículos foi maior em cabras tratadas com eCG e pFSH versus hCG (P = 0,003), enquanto o diâmetro ovulatório do maior folículo não diferiu entre os grupos. A taxa de crescimento folicular foi similar entre os grupos (0,80 ± 0,08 mm/dia) (P = 0,254).

O intervalo entre a remoção da esponja (MAP) e ovulação foi mais curta no grupo eCG (47,62 ± 2,80) e mais longa para os grupos pFSH (66,28 ± 8,16) e hCG (62,07 ± 6,40; P = 0,048). Nenhuma diferença significativa foi observada com relação ao intervalo entre início do cio e ovulação entre os grupos (P = 0,350).

Tabela 1. Média (± erro padrão) da dinâmica folicular em cabras leiteiras Toggenburg submetidas à indução do estro sincronizado com acetato de medroxiprogesterona (MAP, 6 dias), d-cloprostenol e diferentes gonadotrofinas (hCG – 300 UI, eCG – 200 UI ou pFSH – 30 UI), 24 h antes da remoção da esponja, durante o período de transição sazonal (dezembro, 21ºS).

Parâmetros	Gonadotrofinas			
	eCG (n = 31)	pFSH (n = 29)	hCG (n = 25)	Valor de P
Nº total de folículos (≥ 3 mm) no dia da aplicação gonadotrofina	4,75 ± 0,29	5,11 ± 0,30	4,84 ± 0,39	0,699
Diâmetro do maior folículo no dia da aplicação gonadotrofina (mm)	6,69 ± 0,25^{a}	6,18 ± 0,32^{ab}	5,61 ± 0,19^{b}	0,024*
Diâmetro máximo do maior folículo dominante (mm)	8,54 ± 0,16	8,40 ± 0,22	8,00 ± 0,18	0,137
Dia do diâmetro máximo do folículo dominante (dia)⊥	6,87 ± 0,20^{a}	7,85 ± 0,30^{b}	8,16 ± 0,30^{c}	0,002*
Nº total de folículos pré-ovulatórios	1,66 ± 0,10^{a}	1,25 ± 0,07^{b}	1,85 ± 0,12^{a}	0,004*
Diâmetro médio dos folículos ovulatórios	7,72 ± 0,15^{a}	8,06 ± 0,18^{a}	7,12 ± 0,17^{b}	0,003*
Diâmetro do maior folículo ovulatório (mm)	8,42 ± 0,18	8,37 ± 0,22	7,80 ± 0,18	0,120
Taxa de crescimento folicular (mm/dia)	0,72 ± 0,08	0,72 ± 0,09	0,84 ± 0,07	0,524
Intervalo entre a remoção da esponja e ovulação (hs)	47,62 ± 2,80^{b}	66,28 ± 8,16^{a}	62,07 ± 6,40^{a}	0,048*
Intervalo entre início do estro e ovulação (hs)	28,99 ± 2,67	29,76 ± 3,66	23,41 ± 3,87	0,350

*Letras diferem entre si na mesma linha. mm = milímetros; ⊥Dia 0 = dia de início do protocolo de indução do estro; dia aleatório do ciclo estral ou período anovulatório.

4.2 Comportamento Estral e Taxas de Concepção

Todos os grupos apresentaram alta porcentagem de resposta ao estro (média = 96,52 %; P = 0,948). O intervalo entre a remoção da esponja para o início do estro foi semelhante em ambos os grupos, com média geral de 35,55 ± 1,11 horas (P = 0,232). A duração do estro também não diferiu entre os tratamentos, obtendo-se como média 34,58 ± 2,79 horas (P = 0,676).

A taxa de concepção e prenhez não diferiu entre os grupos (P = 0,747; P 0,867, respectivamente; Tabela 2).

Tabela 2. Média (± erro padrão) de parâmetros de estro, taxa de concepção e prenhez em cabras leiteiras Toggenburg submetidas ao protocolo de indução e sincronização do estro de curta duração (MAP, 6 dias) com diferentes gonadotrofinas (hCG – 300 UI, eCG – 200 UI ou pFSH – 30 UI), no período de transição sazonal (dezembro, 21ºS).

Parâmetros	Gonadotrofinas			Valor de P
	eCG (n = 41)	pFSH (n = 40)	hCG (n = 34)	
Resposta ao estro (%)	100 [41/41]	92,50 [37/40]	97,06[33/34]	0,948
Intervalo da remoção da esponja e início do estro (h)	29,11 ± 1,11	38,76 ± 1,54	38,65 ± 1,65	0,232
Duração de estro (h)	32,91 ± 2,55	36,19 ± 2,91	34,65 ± 2,93	0,676
Taxa de concepção (%)	73,17 [30/41]	67,56 [25/37]	56,57 [19/33]	0,747
Taxa de prenhez (%)	73,17 [30/41]	62,05 [25/40]	52,94 [18/34]	0,867

*Letras diferem entre si na mesma linha. h = hora.

4.3 Dinâmica Luteal

Treze animais não ovularam sendo cinco do grupo eCG e sete do grupo pFSH (P = 0,867). Todos os animais do grupo hCG ovularam, mas uma cabra do grupo hCG e outra do grupo pFSH sofreram regressão prematura do corpo lúteo.

A Tabela 3. mostra o percentual de ovulações e os parâmetros biométricos, ecogênicos e vasculares dos corpos lúteos encontrados em cada grupo experimental. O percentual de ovulação não diferiu entre os grupos. O grupo hCG foi caracterizado pelo maior número de estruturas luteais (P = 0,0001), mas os corpos lúteos apresentaram diâmetro e volume médios menores quando comparado com os grupos eCG e pFSH (P > 0,05; Tabela 3). Nenhuma diferença foi encontrada em relação à área luteal (P = 0,638; Tabela 3).

A ecogeneidade e heterogeneidade dos corpos lúteos também se mostrou semelhante entre os tratamentos (Tabela 3; P = 0,743 e 0,581; respectivamente). E

nenhuma diferença significativa foi detectada com relação aos parâmetros vasculares, tanto avaliados pela da contagem de pixels coloridos (P = 0,215), quanto pelo escore de vascularização (Tabela 3; P = 0,810).

Tabela 3. Média (± erro padrão) de parâmetros de corpos lúteos formados (D 5 ao 28) após indução do estro sincronizado com acetato de medroxiprogesterona (MAP, 6 dias), d-cloprostenol e diferentes gonadotrofinas (hCG – 300 UI, eCG – 200 UI ou pFSH – 30 UI), 24 horas antes da remoção da esponja, no período de transição sazonal (dezembro, 21°S).

Parâmetros	eCG (n = 36)	pFSH (n = 32)	hCG (n = 32)	Valor de P
Taxa de Ovulação (%)	87,80 [36/41]	82,50 [33/40]	97,05 [33/34]	0,867
Número de CLs	1.60 ± 0.73b	1.35 ± 0.68c	1.90 ± 0.95a	0,0001
Diâmetro (mm)	10,57 ± 0,20[a]	10,88 ± 0,27[a]	9,74 ± 0,20[b]	0,036
Volume (mm^3)	8,30 ± 0,15[a]	8,55 ± 0,212[a]	7,66 ± 0,15[b]	0,037
Área (cm^2)	1,23 ± 0,04	1,14 ± 0,03	1,50 ± 0,49	0,638
Ecogeneidade (VNP)	54,28 ± 1,22	51,06 ± 1,97	46,80 ± 1,75	0,473
Heterogeneidade[†]	8,00 ± 0,20	8,60 ± 0,72	8,10 ± 0,66	0,581
Vascularização (Pixels)	4443 ± 219	4238 ± 238	3377 ± 211	0,215
Escore de vascularização[††]	2,38 ± 0,05	2,40 ± 0,07	1,98 ± 0,05	0,810

[†] Heterogeneidade calculada com base no desvio padrão da VNP.
[††] Estimativa subjetiva do escore de vascularização: 1 (0 – 25%), 2 (26 – 50%), 3 (51 – 75%) e 4 (76 – 100%).
*Letras diferentes entre as colunas diferem entre si. Dia 0 = dia do início do estro, dois dias da remoção da esponja intravaginal de MAP.

Os parâmetros biométricos do corpo lúteo, com exceção da área, também foram influenciados pela interação da categoria do corpo lúteo (prenhe e não prenhe), tratamentos e dia da avaliação (Tabela 4; P < 0,05). O diâmetro e volume dos corpos lúteos de cabras prenhes entre os Dias 5, 8 e 13 foram semelhantes entre os grupos (P > 0,05), mas exclusivamente no Dia 18, o corpo lúteo de cabras prenhes do grupo eCG e pFSH apresentaram dimensões maiores em relação aos CLs de cabras prenhes do grupo hCG (P < 0,05). Tal diferença perpetuou-se nas avaliações

posteriores (Dia 23 e 28) entre o grupo pFSH versus hCG ($P < 0,05$). O que não ocorreu com o grupo eCG, que apresentou valores intermediários em relação ao grupo pFSH e hCG nos Dias 23 e 28 ($P > 0,05$).

Diferenças do diâmetro e volume do corpo lúteo de cabras prenhes ao longo das avaliações foram detectadas apenas no grupo eCG e pFSH (Tabela 4). O tamanho do corpo lúteo de cabras prenhes no grupo eCG e pFSH entre os Dias 5 e 8 foi menor em comparação as dimensões encontradas no Dia 13, 18, 23 e 28 ($P < 0,05$). Ao contrário, no grupo hCG tais alterações do tamanho do corpo lúteo de cabras prenhes não diferiram ao longo das avaliações (Tabela 4; $P > 0,05$).

O diâmetro e volume do corpo lúteo de cabras não prenhes apresentaram redução significativa de suas dimensões nos Dias 18, 23 e 28 em todos os grupos (Tabela 4; $P < 0,05$). A distinção de cabras prenhes e não prenhes pelas diferenças de tamanho do corpo lúteo foram detectadas mais precocemente no grupo eCG e pFSH (Dia 18), quando comparadas com o grupo hCG (Dia 23; $P < 0,05$).

Tabela 5. Média (± erro padrão) de parâmetros de corpos lúteos formados (D 5 ao 28) de cabra prenhes e não prenhe, após indução do estro sincronizado com acetato de medroxiprogesterona (MAP, 6 dias), d-cloprostenol e diferentes gonadotrofinas (hCG – 300 UI, eCG – 200 UI ou pFSH – 30 UI), 24 horas antes da remoção da esponja, durante o período de transição sazonal (dezembro, 21°S).

	Dia	eCG		pFSH		hCG		Valor de P
		Prenhe	Não prenhe	Prenhe	Não prenhe	Prenhe	Não prenhe	
Diâmetro (mm)	D5	8,00 ± 0,41^{f}	9,71 ± 0,86 ^{ef}	7,66 ± 0,53 ^{f}	10,10 ± 2,32 ^{def}	7,36 ± 0,52 ^{f}	7,93 ± 0,71^{f}	0,043
	D8	9,60 ± 0,33 ^{f}	11,54 ± 0,84^{bcde}	10,12 ± 0,61^{def}	10,37 ± 1,32 ^{def}	9,76 ± 0,48^{ef}	9,08 ± 0,58 ^{f}	
	D13	11,89 ± 0,25^{bcd}	10,98 ± 0,86^{cdef}	12,55 ± 0,28 ^{abc}	12,22 ± 0,64 ^{abcd}	11,28 ± 0,31^{cdef}	10,77 ± 0,63^{def}	
	D18	12,82 ± 0,25^{ab}	8,61 ± 1,48^{f}	13,16 ± 0,36^{a}	10,91 ± 0,73^{cdef}	11,19 ± 0,44^{def}	9,19 ± 0,63 ^{f}	
	D23	11,99 ± 0,36^{abcd}	4,53 ± 1,56^{g}	13,04 ± 0,39^{ab}	2,95 ± 1,96^{gh}	10,82 ± 0,44^{def}	4,66 ± 0,81^{g}	
	D28	12,19 ± 0,31^{abcd}	2,96 ± 1,52^{gh}	13,06 ± 0,28^{ab}	2,82 ± 1,82^{gh}	10,39 ± 0,44^{def}	1,85 ± 0,76^{h}	
Volume (mm^3)	D5	6,28 ± 0,32 ^{f}	7,62 ± 0,67 ^{ef}	6,02 ± 0,42 ^{f}	7,93 ± 1,75 ^{def}	5,78 ± 0,40 ^{f}	6,24 ± 0,56 ^{f}	0,046
	D8	7,54 ± 0,26 ^{f}	9,06 ± 0,66 ^{bcde}	7,94 ± 0,47 ^{def}	8,14 ± 1,04 ^{def}	7,67 ± 0,38 ^{ef}	7,13 ± 0,45 ^{f}	
	D13	9,33 ± 0,26 ^{bcd}	8,62 ± 0,68 ^{def}	9,86 ± 0,22 ^{abc}	9,60 ± 0,50 ^{abcd}	8,87 ± 0,24 ^{cdef}	8,46 ± 0,50 ^{def}	
	D18	10,07 ± 0,20 ^{ab}	6,76 ± 1,16 ^{f}	10,33 ± 0,28 ^{a}	8,57 ± 0,57 ^{def}	8,85 ± 0,35 ^{def}	7,22 ± 0,50 ^{f}	
	D23	9,42 ± 0,29^{abcd}	3,55 ± 1,22^{g}	10,18 ± 0,31^{ab}	2,32 ± 1,54^{gh}	8,50 ± 0,39^{def}	3,52 ± 0,65^{g}	
	D28	9,57 ± 0,24^{abcd}	2,32 ± 1,20^{gh}	10,26 ± 0,21^{ab}	2,22 ± 1,43^{gh}	8,16 ± 0,35^{def}	1,46 ± 0,60^{h}	
Área (cm^2)	D5	0,97 ± 0,15	0,88 ± 0,13	0,69 ± 0,05	1,33 ± 0,49	0,67 ± 0,05	0,69 ± 0,08	0,463
	D8	1,06 ± 0,04	1,81 ± 0,59	1,07 ± 0,06	1,12 ± 0,17	1,14 ± 0,16	0,92 ± 0,07	
	D13	1,38 ± 0,05	1,19 ± 0,10	1,39 ± 0,05	1,22 ± 0,15	1,15 ± 0,05	1,16 ± 0,07	
	D18	1,48 ± 0,05	0,92 ± 0,20	1,41 ± 0,06	0,97 ± 0,12	1,22 ± 0,06	0,97 ± 0,16	
	D23	1,35 ± 0,06	0,34 ± 0,12	1,46 ± 0,08	0,18 ± 0,18	1,19 ± 0,04	0,27 ± 0,09	
	D28	1,27 ± 0,05	0,24 ± 0,13	1,45 ± 0,07	0,11 ± 0,11	1,12 ± 0,04	0,40 ± 0,39	

*Letras diferentes entre as colunas diferem entre si. Dia 0 = dia do início do estro, dois dias da remoção da esponja intravaginal de MAP.

A ecogeneidade dos corpos lúteos foi influenciada pela interação dos tratamentos e dia da avaliação (P = 0,001; Tabela 5). Houve um aumento significativo da ecogeneidade do corpo lúteo de cabras prenhes no Dia 23 e 28 no grupo pFSH e apenas sobre o Dia 28 no grupo eCG e hCG, comparados principalmente com o início das avaliações (Dia 5; P < 0,001). Além disso, a ecogeneidade do corpo lúteo de cabras prenhes no Dia 18 no grupo pFSH e hCG apresentaram maiores valores em relação aos CLs de cabras prenhes do grupo eCG (P < 0,05).

A ecogeneidade se mostrou diferente no corpo lúteo de cabras não prenhes, sendo caracterizados pela redução dos valores em ambos os grupos a partir do Dia 18, tal declínio foi mais acentuado no grupo pFSH, seguido do grupo eCG e menor no grupo hCG (P < 0,05; Tabela 5). O Dia 18 também foi marcado pelo momento da distinção dos valores de ecogeneidade entre corpos lúteos de cabras prenhes e não prenhes. Assim, corpos lúteos de cabras prenhes apresentaram maiores valores que o corpo lúteo de cabras não prenhes, este comportamento foi evidenciado em todos os tratamentos.

Tabela 5. Média (± erro padrão) de parâmetros da ecogeneidade de corpos lúteos (D 5 ao 18) de cabra prenhe e não prenhe, após indução do estro sincronizado com acetato de medroxiprogesterona (MAP, 6 dias), d-cloprostenol e diferentes gonadotrofinas (hCG – 300 UI, eCG – 200 UI ou pFSH – 30 UI), no período de transição sazonal (dezembro, 21°S).

Dia	eCG		pFSH		hCG	
	Prenhe	Não prenhe	Prenhe	Não prenhe	Prenhe	Não prenhe
D5	52,87 ± 1,14^{def}	52,55 ± 3,03^{def}	52,58 ± 1,86^{def}	56,07 ± 7,14^{cde}	54,20 ± 1,34^{def}	55,39 ± 2,02^{de}
D8	49,56 ± 1,10^{ef}	43,35 ± 3,94^{f}	49,79 ± 1,40^{ef}	50,55 ± 2,75^{def}	50,41 ± 1,66^{ef}	53,14 ± 1,82^{def}
D13	54,00 ± 1,00^{def}	51,31 ± 2,47^{def}	55,27 ± 1,11^{de}	60,30 ± 2,55^{abcd}	57,90 ± 1,29^{cd}	53,12 ± 2,43^{def}
D18	58,48 ± 1,03^{cd}	50,11 ± 4,10^{ef}	57,94 ± 1,46^{cd}	46,97 ± 4,04^{ef}	58,55 ± 1,14^{bcd}	46,86 ± 3,40^{ef}
D23	58,54 ± 1,31^{cd}	24,14 ± 7,12^{g}	60,16 ± 1,36 ^{ab}	3,80 ± 3,80^{h}	62,90 ± 1,16 ^{ab}	26,63 ± 4,93^{d}
D28	60,89 ± 1,31^{abc}	0,00 ± 0,00 ^{h}	61,42 ± 1,25 ^{ab}	0,00 ± 0,00^{h}	63,94 ± 1,16 ^{a}	3,81 ± 2,14^{e}

*Letras diferentes entre as colunas e linhas diferem entre si (P = 0,001). Dia 0 = dia do início do estro, dois dias da remoção da esponja intravaginal de MAP.

A heterogeneidade, escore de vascularização bem como o número de pixels coloridos do corpo lúteo de cabras prenhes e não prenhes não foi afetada pela interação entre tratamentos e dia da avaliação (P = 0,932; P = 0,637; P = 0,332 [dados não demonstrados]), mas quando o efeito do tratamento foi removido da análise, uma interação significativa entre a categoria do corpo lúteo (prenhes e não prenhes) e dia da avaliação foi detectado (Tabela 6). A heterogeneidade se manteve estável ao longo do dia das avaliações no corpo lúteo de cabras prenhes, mas uma diferença entre corpo lúteo de cabras prenhes e não prenhes foi observado sobre o Dia 23, tal diferença foi caracterizada pela redução da heterogeneidade nos animais não gestantes (P < 0,001).

Tabela 6. Média (± erro padrão) de parâmetros de heterogeneidade (Pixels) e vascularização (escore de vascularização e número de pixels coloridos) dos corpos lúteos (D5 a 28) de cabra prenhe e não prenhe no período de transição sazonal (dezembro, 21°S).

Parâmetro	DG	D 5	D 8	D 13	D 18	D 23	D 28
Heterogeneidade (Pixels)	Prenhe	9,19 ± 0,18 [a]	10,69 ± 0,95 [a]	8,30 ± 0,13 [a]	9,01 ± 0,15 [a]	10,34 ± 0,87 [a]	9,75 ± 0,65 [a]
	Não prenhe	9,75 ± 0,36[a]	9,22 ± 0,28 [a]	8,21 ± 0,25 [a]	7,66 ± 0,41 [a]	3,34 ± 0,54 [b]	0,38 ± 0,22 [b]
Escore Vascularização (1 – 4)	Prenhe	2,00 ± 0,05 [a]	2,40 ± 0,05 [a]	2,64 ± 0,05 [a]	2,60 ± 0,05 [a]	2,57 ± 0,05 [a]	2,59 ± 0,05 [a]
	Não prenhe	2,13 ± 0,12 [a]	2,17 ± 0,12 [a]	2,48 ± 0,10 [a]	1,77 ± 0,13 [b]	1,07 ± 0,05 [c]	0,98 ± 0,01 [c]
N° de Pixels Coloridos (Pixels)	Prenhe	3859 ± 389 [a]	4649 ± 154[a]	5710 ± 198[a]	5423 ± 169[a]	4882 ± 272[a]	4553 ± 163[a]
	Não prenhe	2568 ± 339[a]	4108 ± 337[a]	5042 ± 296 [a]	3388 ± 616 [a]	321 ± 204 [b]	0,00 ± 0,00[b]

*Letras diferentes entre as colunas diferem entre si. Dia 0 = dia do início do estro, dois dias da remoção da esponja intravaginal de MAP (P < 0,001).

A vascularização do corpo lúteo de cabras gestantes, independente se avaliada pelo escore de vascularização ou pela contagem de pixels coloridos não sofreu alteração no decorrer dos dias (Tabela 6). Diferenças no percentual de vascularização entre corpos lúteos de cabras prenhes e não prenhes foram perceptíveis sobre o Dia 18 pela avaliação subjetiva do escore de vascularização e foram significativamente maiores nos animais gestantes comparados com não gestantes (Tabela; $P < 0,001$). Resultado semelhante foi obtido quando o número de pixels coloridos foi utilizado para a estimativa da vascularização, corpo lúteo de cabras não prenhes apresentaram redução de pixels coloridos sobre os Dias 23 e 28 quando comparados com corpo lúteo de cabras prenhes ($P < 0,001$).

5 DISCUSSÃO

Espera-se de um bom protocolo de indução do estro o maior número de animais com início de estro sincronizado e alta taxa de ovulação para que se obtenha taxa de concepção acima de 60 %. Em mais detalhes, almeja-se que este seja capaz de induzir adequado crescimento final dos folículos e que embora possa aumentar o número de ovulações (ADRIYANTO et al., 2017) não se espera superovulação (≥ 4 corpos lúteos, Oliveira et al., 2012). Pretende-se ainda que os corpos lúteos formados tenham capacidade de sintetizar quantidades suficientes de progesterona, fundamentais para o reconhecimento e manutenção da gestação (FONSECA; TORRES, 2005). Para o melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo sobre a dinâmica luteal em resposta a protocolos com diferentes gonadotrofinas (eCG, hCG e pFSH) em caprinos.

No presente estudo a hCG e o pFSH mostraram-se tão eficientes quanto a eCG na indução do estro sincronizado e ovulação, mas com diferenças na dinâmica folicular ovulatória. A eCG foi a gonadotrofina que induziu o início do estro mais precoce, o reduzido intervalo de início de estro e ovulação após a remoção da esponja com eCG tem sido observada em outros estudos (MENCHACA et al., 2007; COX et al., 2012). A eCG tem ação direta sobre os receptores de LH nos folículos, o que estimulam a produção de estradiol, e consequentemente, início do comportamento de estro e antecipação do pico pré-ovulatório de LH e ovulações (MENCHACA et al., 2007; FATET; PELLICER-RUBIO; LEBOEUF, 2011a). O mesmo pode ser esperado como ação da hCG, por sua ação majoritária de LH (Saleh et al., 2012). Entretanto, diferenças no momento de início de estro e no diâmetro médio dos folículos pré-ovulatórios entre eCG e hCG foram registrados no presente estudo. A razão possivelmente está relacionada ao maior diâmetro do maior folículo no dia da aplicação da gonadotrofina no grupo eCG em relação ao hCG. Esta também pode ser a explicação para o mais tardio dia do diâmetro máximo do folículo dominante para as fêmeas que receberam a hCG. Ainda assim, a hCG parece ter atuado adequadamente como promotor do desenvolvimento folicular ovulatório, visto que o diâmetro do maior folículo pré-ovulatório não diferiu em relação as outras gonadotrofinas. A partir desta informação, pode-se confirmar que a hCG teve efeito

compensatório em relação a condição da população ovariana ao início do tratamento. Esta condição foi inesperada, uma vez que vários outros critérios foram utilizados para garantir uma distribuição homogênea dos animais entre os grupos.

O pFSH também garantiu adequado desenvolvimento dos folículos. O diâmetro médio dos folículos pré-ovulatórios neste grupo foi igual ao grupo que recebeu a eCG, embora possa ser notado que o dia do diâmetro máximo do folículo dominante tenha sido mais tardio para as fêmeas que receberam o pFSH. A explicação para o maior tempo para que o folículo alcançasse seu maior diâmetro pode estar relacionada as particularidades químicas e farmacocinéticas do FSH, especificamente, alta relação FSH:LH e meia vida curta (~ 10 h) (Nogueira et al., 2014). Apesar das diferenças mencionadas da dinâmica folicular ovulatória entre os grupos, a taxa de crescimento folicular foi similar. Esta variável foi a média obtida no período entre o dia da aplicação das gonadotrofinas e o momento da ovulação, mas talvez se calculada em períodos específicos dentro do desenvolvimento folicular possam ser evidenciadas diferenças entre os grupos, confirmando atuação distinta entre as gonadotrofinas ao longo da dinâmica folicular. Ademais, o crescimento mais lento dos folículos em resposta ao pFSH podem justificar o maior tempo para início de estro e ovulação em relação a eCG. A resposta ao estro e ovulação estão diretamente relacionadas a produção de estrógeno e por sua vez com o tamanho do folículo pré-ovulatório, mas por se tratar de uma espécie multiovulatória, o número de ovulações também influencia. O pFSH induziu um menor número de folículos pré-ovulatórios. O intervalo para início de estro e ovulação em relação a remoção da fonte de progestágeno observado neste estudo estão de acordo com outros relatos (ALVARADO-ESPINO et al., 2016; FONSECA et al., 2017).

O tipo de gonadotrofina empregada não influenciou o intervalo do início de estro para a ovulação, a duração do estro, bem como a taxa de concepção (média de 65,73%); percentuais semelhantes aos encontrados por Fonseca et al. (2017); Fonseca et al. (2005); Souza et al. (2011) em resposta a protocolos com eCG, hCG e pFSH em caprinos. Mesmo a eficiência final (taxa de concepção) não ter diferido em resposta as distintas gonadotrofinas, houve variação em relação a dinâmica luteal. A hCG foi a gonadotrofina que promoveu maior resposta ovulatória (i.e. número de corpos lúteos). Doses altas de

gonadotrofinas elevam a taxa de ovulação (ADRIYANTO et al., 2017). O maior número de ovulações em resposta ao uso de 300 UI de hCG, no presente estudo, pode estar relacionada a dose empregada. Relatos anteriores com a aplicação de eCG (200 UI) e hCG (250 UI) em cabras não registraram diferenças no número de corpos lúteos (Fonseca et al., 2017; Fonseca et al., 2005).

Apesar da maior resposta ovulatória, o grupo hCG teve as dimensões médias (diâmetro e volume) dos corpos lúteos menores em relação aos outros grupos. O tamanho do corpo lúteo é diretamente relacionado ao tamanho do folículo pré-ovulatório (Camp et al., 1983). No presente estudo, as fêmeas que receberam a hCG tiveram menor diâmetro médio de folículos pré-ovulatórios, o que pode explicar as menores dimensões médias dos corpos lúteos. Estes achados também podem ser justificados por ovulações de folículos de diferentes tamanhos em um mesmo animal (por exemplo, 4,6 – 9,0 mm; dados não apresentados). Esta ampla variação no diâmetro dos folículos ovulatórios é uma característica comum em cabras, tendo sido registrada ovulações de folículos entre 5,9 a 9,8 mm de diâmetro (FONSECA et al., 2017) e corpos lúteos de diferentes tamanhos são detectados em um mesmo animal (CAMP et al., 1983). Estudos mostram que o tamanho do corpo lúteo também pode ser afetada pela taxa ovulatória, desde que em ovelhas de alta prolificidade apresentam corpos lúteos de tamanho reduzido (BARTLEWSKI; BEARD; RAWLINGS, 1999c). Ademais, pôde-se notar maior diferença de dimensões entre o maior e o menor folículos pré-ovulatórios e correspondentes corpos lúteos em indivíduos que receberam a hCG do que naqueles tratados com eCG ou pFSH, resultando assim em redução das medidas médias dos folículos e corpos lúteos. Pode-se sugerir que em virtude da alta afinidade da hCG pelos receptores de LH (GNANAPRAKASAM; GUPTA; G. P. TALWAR, 1976), a gonadotrofina tenha induzido a ovulação de folículos de menores tamanhos, que talvez não ovulariam espontaneamente.

Ao analisar o desenvolvimento luteal dos CLs de cabras gestantes ao longo dos dias de avaliações no presente estudo, notou-se que o CL de cabras prenhes do grupo eCG e pFSH apresentaram aumento das dimensões luteais sobre o Dia 18, seguida de uma fase de platô, caracterizada pela ausência de diferenças estatísticas entre os Dias 18, 23 e 28. A formação do corpo lúteo ocorre de forma gradativa, inclui um aumento

exponencial das dimensões luteais observado sobre o Dia 9 (Dia 0 = início do estro) ou Dia 12 (Dia 0 = ovulação) seguido de um período estático de crescimento (ARASHIRO et al., 2010c; BALARO et al., 2017a). Assim, o comportamento do CL de cabras prenhes, evidenciados no grupo eCG e pFSH condiz com o relatado na literatura. Ademais, as diferenças no tempo para o alcance do diâmetro e volume máximo (Dia 18 versus Dia 9 e 12), podem ter sido ocasionadas pela menor frequência de avaliações no presente estudo.

Alterações no desenvolvimento luteal podem com frequência culminar com a regressão prematura do corpo lúteo. Segundo Camp et al (1983), CLs podem ser divididos em dois tipos, o Tipo I geralmente desenvolvem-se de folículos pré-ovulatórios de diâmetros maiores (7,1 ± 0,4 mm), crescem de maneira gradual e atingem cerca de 9,4 ± 0,6 mm sobre o Dia 11 do ciclo estral; enquanto o Tipo II resulta de folículos pré-ovulatórios pequenos (5,6 ± 0,6 mm) e são caracterizados por um crescimento inexpressivo após a ovulação, alcançando diâmetro médio máximo de 4,4 ± 0,4 mm no Dia 11. No presente estudo, o corpo lúteo de cabras prenhes do grupo hCG diferenciaram-se do grupo eCG e pFSH com relação ao seu padrão desenvolvimento. Neste grupo, a fase de crescimento e platô não foi evidenciada comparada aos demais grupos e com achados de estudos anteriores. Ao primeiro momento, surgiu a hipótese de que corpos lúteos induzidos por hCG poderiam ser do tipo II. No entanto, o tamanho médio do corpo lúteo de cabras do grupo hCG sobre o Dia 18 era de 11,19 ± 0,44 mm (diam) e 8,85 ± 0,35 mm^3 (vol), descartando-se a hipótese de corpo lúteo anormal. Apesar progesterona sérica não ter sido dosada no presente estudo, apenas uma cabra no grupo hCG apresentou regressão prematura do corpo lúteo.

Outro fator que pode estar associada com a baixa expressividade da curva de crescimento do corpo lúteo de cabras prenhes no grupo hCG é maior taxa ovulatória. É reconhecido que múltiplas ovulações (> 3 corpos lúteos/ovário) dificultam a delimitação das estruturas luteais e o que pode resultar em valores nem sempre fidedignos (CAMP et al., 1983; ARASHIRO et al., 2010b). Além disso, em ovelhas, tem sido demonstrado que fêmeas de alta prolificidade resultam em corpos lúteos naturalmente pequenos comparadas com animais de uma única ovulação (BARTLEWSKI; BEARD; RAWLINGS,

1999c). Tais diferenças contribuem para o esclarecimento do tamanho relativamente menor do corpo lúteo de cabras prenhes no grupo hCG sobre os Dias 23 e 28, visto que, eCG e pFSH foram caracterizados por menor número de estruturas luteais e corpo lúteo com maiores dimensões.

Ao contextualizar o perfil de evolução do corpo lúteo de cabras não prenhes ao longa das avaliações com base nos grupos experimentais, estes apresentaram alterações correspondentes a normalidade. A luteólise é marcada por uma redução primeiramente funcional e posteriormente estrutural do corpo lúteo (BALARO et al., 2017a). A redução da atividade funcional refere-se a queda brusca de progesterona (< 1 ng/mL) e do percentual (~ 85%) de área vascularizada do corpo lúteo (BALARO et al., 2017a). Enquanto a luteólise estrutural está relacionada ao declínio das dimensões luteais em cerca de 53% do volume, 38 % da área e 20 % do diâmetro, comparada a fase estática da luteogênese (ARASHIRO et al., 2010c; BALARO et al., 2017a). Assim, o processo de lutéolise pode ser identificada precocemente pela ultrassonografia Doppler e Modo B a partir do Dia 16 (Dia 0 = ovulação) (BALARO et al., 2017a).

No presente estudo, a luteólise estrutural em cabras não gestantes foi mais evidente sobre o Dia 23, entretanto, diferenças entre corpo lúteo de cabras gestante e não gestantes foram detectadas sobre o Dia 18 em todos os grupos. A relativa divergência dos achados, pode estar associada com o momento de avaliação, visto que Balaro et al. (2017) considerou o Dia “0”, como o momento da ovulação, ao contrário do presente estudo, que se baseou pelo início do estro. Além do mais, diferenças entre corpos lúteos de animais prenhes e não prenhes foram logo detectadas sobre o Dia 18, 23 e 28, independente do tratamento e número de ovulações. Estas informações reiteram com os achados de Cosentino et al., (2018), que mostraram que o diagnóstico de gestação pode ser presumido precocemente pelas alterações morfológicas do corpo lúteo, com acurácia de 52,94 % no Dia 18 e de 96,08 % quando realizada sobre o Dia 23 pós-cópula.

A ecogeneidade dos corpos lúteos representa alterações estruturais do tecido ao longo do ciclo estral (DAVIES et al., 2006). Corpos lúteos formados a partir da ovulação espontânea em cabras apresentam aumento gradativo de valor numérico de pixels até o Dia 13 do ciclo estral, seguido de um declínio associada a luteólise do corpo lúteo (Dia 0

= identificação do estro; Arashiro et al., 2010a). Estas alterações foram observadas no presente estudo, porém o aumento do valor de pixel elevou-se mais precisamente sobre o último dia de avaliação (Dia 28) no corpo lúteo de cabras prenhes. Enquanto, que o valor númerico de pixel do corpo lúteo de cabras não prenhes reduziram a partir do Dia 23 na maioria dos grupos.

A presença de valores de pixel zero no corpo lúteo de cabras não prenhe sobre o Dia 28 no grupo eCG e pFSH, pode estar associada a regressão luteal mais acentuada neste grupo devido ao menor número de ovulação. O presente estudo não objetivou-se avaliar se o tempo de luteólise é influenciado pelo número de corpos lúteos no ovário, mas é pertinente supor que ovários com menor área de tecido luteal regridam de forma mais acelerada que áreas com maior número de estruturas luteais. Diversas autores relatam que a mensuração dos parâmetros biométricos do corpo lúteo é mais laboriosa em animais com duplas ou triplas ovulações, devido a baixa delimitação (BARTLEWSKI; BEARD; RAWLINGS, 1999c; ARASHIRO et al., 2010b, 2010c; BALARO et al., 2017a). Durante as últimas avaliações dos corpos lúteos de animais não prenhe, principalmente do grupo hCG, houve grande dificuldade em diferenciar a ecogeneidade das estruturas luteais e do estroma ovariano, devido a baixa delimitação do corpo lúteo em regressão e maior número de corpos lúteos neste grupo. Assim, é possivel que a avaliação do pixel nas utlimas avaliações não tenha sido realizada precisamente do tecido luteal, mas tbem do estroma ovariano.

A heterogeneidade e os parâmetros vasculares avaliados pelo número de pixels coloridos e pelo escore de vascularização não diferiram entre os grupos experimentais ([dados não demonstrados]; $P > 0,05$). Esta interação foi realizada no intuito de se investigar se a vascularização do CL poderia ser influenciada pelo tipo de gonadotrofina. Visto que, o uso de pFSH em protocolos de superovulação em búfalas ocasionou no aumento da expressão de fatores e receptores angiogênicos, tais como o VEGF e FGF2 (RIGOGLIO et al., 2013). Desta forma, sugere-se que o uso de uma única dose de gonadotrofina tenha sido insuficiente de induzir alterações exacerbadas na vascularização do corpo lúteo, mas que foram eficientes o suficiente para induzirem o desenvolvimento de corpos lúteos funcionais.

A densidade vascular do corpo lúteo em cabras aumenta em cerca de 33 % (expressa pelo número de vasos por área) do Dia 2 ao 12 pós-ovulação, mas o completo desenvolvimento da rede vascular ocorre entre o Dia 12 e 16 (MIRANDA-MOURA et al., 2010). Estudos mostram que a vascularização do corpo lúteo (ultrassonografia Doppler colorida) aumenta de forma gradativa e estabiliza-se entre os Dias 7 a 13, quando atinge o pico máximo de vascularização (75% da área luteal) e apenas declina em função da luteólise (BALARO et al., 2017a). Assim, corpo lúteo de cabras gestantes são caracterizados por um percentual de vascularização maior que 50%, e se mantem estável ao longo do ciclo estral (BALARO et al., 2017a). Este comportamento foi observado no presente estudo, os resultados da heterogeneidade, escore de vascularização e número de pixels coloridos no corpo lúteo de cabras prenhe não sofreram alterações ao longo dos dias de avaliações, mas os valores encontrados no corpo lúteo de cabras não prenhes declinaram sobre o Dia 18 e 23.

Os resultados encontrados no presente estudo ainda revelaram achados interessantes com relação as características morfológicas do corpo lúteo de cabras prenhes e não prenhes. Grande parte dos parâmetros avaliados tais como diâmetro, volume, ecogeneidade e escore de vascularização entre gestantes e não gestantes podem ser diferenciados sobre o Dia 18 (pós – cópula), com exceção a heterogeneidade que sofreu alteração apenas sobre o Dia 23. Estas observações são importantes, tendo em vista que, atualmente tais medidas luteais são utilizadas para detecção precoce de anormalidades dos corpos lúteos ou ainda como ferramenta de diagnóstico de gestação (PUGLIESI et al., 2014; VRISMAN et al., 2017; ARASHIRO et al., 2018; COSENTINO et al., 2018).

6 CONCLUSÃO

A hCG e o pFSH são eficientes quanto a eCG na indução da resposta ao estro sincronizado, taxa de concepção e prenhez, entretanto, há diferenças na dinâmica folicular. O intervalo de estro e ovulação após a remoção da esponja foi mais curto no grupo eCG, em consequência de folículos com maiores diâmetros no momento da aplicação da gonadotrofina. A hCG induz maior taxa de ovulação, que levou ao desenvolvimento de corpos lúteos de dimensões menores a eCG e pFSH. Todas as gonadotrofinas resultam no desenvolvimento de corpos lúteos semelhantes e funcionais. As diferenças encontradas nas variáveis diâmetro, volume, ecogeneidade no corpo lúteo de cabras prenhes e não prenhes dos grupos experimentais, rementem-se a capacidade ovulatória de cada gonadotrofina. Conclui-se com base nos achados do comportamento estral, dinâmica folicular, luteal e nas taxas de concepção e prenhez que o uso de hCG e pFSH são alternativas equivalentes a eCG, inclusive quando utilizadas para indução do estro no período de transição. Ademais, recomenda-se que o uso de hCG deva-se priorizado em fêmeas de baixa prolificidade, visto a sua maior capacidade ovulatória.

7 REFERÊNCIAS

Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A (2012) Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science** 130:173–179.

Adriyanto A, Rahminiwati M, Boediono A, Manalu W (2017) Optimum dose and time of pregnant mare serum gonadotropin. **Small Ruminant Research** 149:147–153.

Alvarado-espino AS, Meza-Herrera ca, Carrillo E, González-Álvarez VH, Guillen-Muñoz J M, Ángel-García O, Mellado M, Véliz-Deras FG (2016) Reproductive outcomes of Alpine goats primed with progesterone and treated with human chorionic gonadotropin during the anestrus-to-estrus transition season. **Animal Reproduction Science** 167:133–138.

Arashiro EK, Fonseca JF, Siqueira LGB, Fernandes CA, Brandão FZ, Oba E, Viana JH (2010a). Assessment of luteal function in goats by ultrasonographic image attribute analysis. **Small Ruminant Research** 94:176–179.

Arashiro EK, Ungerfeld R, Clariget RP, Pinto PHN, Balaro MFA, Bragança GM, Ribeiro, LS, Fonseca JF,Brandão FZ (2018) Early pregnancy diagnosis in ewes by subjective assessment of luteal vascularisation using colour Doppler ultrasonography. **Theriogenology** 106: 247–252.

Arashiro, E. K. N.; Viana, J. H. M.; Fonseca, J. F. da; Camargo, L. S. de A.; Fernandes, C. A. de C.; Brandão, F. Z. (2010c) Luteal dynamics in goats: morphological and endocrine features. **Revista Brasileira de Zootecnia** 39:1937–1942.

Arikan Ş, Yigit AA (2003). Changes in the size distribution of goat steroidogenic luteal cells during pregnancy. **Small Ruminant Research** 47:227–231.

Balaro, M. F. A.; Santos, A. S.; Moura, L. F. G. M.; Fonseca, J. F.; F, Z. B (2017a). Luteal dynamic and functionality assessment in dairy goats by luteal blood flow, luteal biometry, and hormonal assay. **Theriogenology** 95:118–126.

Balaro MFA, Souza-Fabjan JMG, Cortês LR, Maia ALRS, Ungerfeld R, Fonseca JF, Brandão FZ (2017b) Sincronização e indução do estro em caprinos leiteiros. **Revista Brasiileira de Reprodução Animal** 41: 330–339.

Baril G, Remy B, Leboeuf JF, Saumande J (1996) Synchronization of estrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time of occorrence of estrus and fertility following artificial insemination. **Theriogenology** 45:1553–1559.

Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC (1998) Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. **Journal of Reproduction and Ferility** 113:275–285.

Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC (1999a) Ovarian function in ewes during the transition from breeding season to anoestrus. **Animal Reproduction Science** 57:51–66.

Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC (1999b) Ovarian function in ewes at the onset of the breeding season. **Animal Reproduction Science** 57: 67–88.

Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC (1999c) An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. **Theriogenology** 52: 115–130.

Bedos M, Flores JA, Fitz-Rodríguez G, Keller M, Malpaux B, Poindron P, Delgadillo JA (2010) Four hours of daily contact with sexually active males is sufficient to induce fertile ovulation in anestrous goats. **Hormones and Behavior** 58:473–477.

Camp JC, Wildt DE, Howard PK, Stuar TLD, Chakraborty PK (1983) Ovarian activity during normal and abnormal length estrous cycles in the goat. **Biology of Reproduction** 28: 673–681.

Castro T, Rubianes E, Menchaca A, Rivero A (1999) Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. **Theriogenology** 52:399–411.

Chasles M, Chesneau D, Moussu C, Poissenot K, Beltramo M, Delgadillo JA Chemineau P, Keller M (2018) Sexually active bucks are a critical social cue that activates the gonadotrope axis and early puberty onset in does. **Hormones and Behavior**, in press: 81–92.

Cheminea P, Gauthier D, Poirier JC, Saumande J (1982) LH,FSH, prolactin, oestradiol 17β and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. **Theriogenology** 17: 313–323.

Coleson MPT,Sanchez NS, Ashley AK, Ross TT, Ashley RL (2015) Human chorionic gonadotropin increases serum progesterone, number of corpora lutea and angiogenic factors in pregnant sheep. **Reproduction** 150: 43–52.

Cosentino IO, Balaro MFA, Leal FSC, Carvalho ABS, Cortat SPR, Arashiro EKN, Brandão FZ (2018) Accuracy of assessment of luteal morphology and luteal blood flow for prediction of early pregnancy in goats. **Theriogenology** 121:104–111.

Cox JF, Allende R, Lara E, Leiva A, Díaz T, Dorado J, Saravia F (2012) Follicular Dynamics, Interval to Ovulation and Fertility After AI in Short-Term Progesterone and PGF2α Oestrous Synchronization Protocol in Sheep. **Reproduction in Domestic Animals** 47:946–951.

Cueto M, Gibbons A, Alberio R, Taddeo H, Gonzalez-Bulnes A (2006) Timing of emergence of ovulatory follicles in polyovulatory goats. **Animal Reproduction Science**, 91:275–284.

Davies KL, Bartlewski PM, Pierson RA, Rawlings NC (2006) Computer assisted image analyses of corpora lutea in relation to peripheral concentrations of progesterone: A comparison between breeds of sheep with different ovulation rates. **Animal Reproduction Science** 96:165–175.

De Rensis F, López-Gatius F,García-Ispierto I, Techakumpu M (2010) Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: An update. **Theriogenology** 73:1001–1008.

Delgadillo JA, Flores JA, Hernández H, Poindron P, Keller M, Fitz-Rodríguez G, Duarte G, Vielma J, Fernández IG, Chemineau P (2015) Sexually active males prevent the display of seasonal anestrus in female goats. **Hormones and Behavior** 69: 8–15.

Dias LMK, Sales JNS, Barro SMBP, Nicolau SS, Simões LMS, Alves MNG, Alonso MA, Valtentim R, Oliveira CA (2018) Although it induces synchronized ovulation, hCG reduces the fertility of Santa Inês ewe submitted to TAI. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, 70: 122–130.

Farin CE, Moeller CL, Sawyer HR, Niswender GD (1986) Morphometric Analysis of Cell Types in the Ovine throughout the Estrous Cycle Corpus Luteum. **Biology of Reproduction** 35:1299–1308.

Fatet A, Pellicer-Rubio MT, Leboeuf B (2011) Reproductive cycle of goats. **Animal Reproduction Science**, 124: 211–219.

Fátima LA, Evangelista MC, Silva RS, Cardoso APM, Baruselli PS, Papa PC (2013) Domestic Animal Endocrinology FSH up-regulates angiogenic factors in luteal cells of buffaloes 45: 224–237.

Fonseca JF **Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos Strategies to control the estrous cycle and superovulation in sheep and goats**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/854509/1/AACEstrategiasparaocontrole.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2018.

Fonseca JF, Bruschi JH, Santos ICC, Viana JHM, Magalhães ACM (2005a) Induction of estrus in non-lactating dairy goats with different estrous synchrony protocols. **Animal Reproduction Science** 85:117–124.

Fonseca JF, Bruschi JH, Zambrini FN, Demczuk E, Viana JHM, Palhao MP (2005) Induction of synchronized estrus in dairy goats with different gonadotrophins. **Animal Reproduction** 2:, n. 1, p. 50–53, 2005b.

Fonseca JF, Souza-Fabjan JMG, Oliveira MEF, Cruz RC, Esteves, LV, Paiva MPSLM de; FZB.; Mancio AB (2017) Evaluation of cervical mucus and reproductive efficiency of seasonally anovular dairy goats after short-term progestagen-based estrous induction protocols with different gonadotropins. **Reproductive Biology**, n. June.

Fonseca JF, Torres CAA (2005) Administration of hCG 5 days after breeding and reproductive performance in nulliparous dairy goats. **Reproduction in Domestic Animals** 40: 495–499.

Fonseca JF, Torres CAA, Costa EP, Maffili VV, Carvalho GR, Alves NG, Rubert MA (2005c) Progesterone profile and reproductive performance of estrous-induced Alpine goats given hCG five days after breeding. **Animal Reproduction** 2: 54–59.

Gao K, Wang P, Peng J, Xue J, Chen K, Song Y, Wang J, Li G, An X, Cao B (2018) Regulation and function of runt-related transcription factors (RUNX1 and RUNX2) in goat granulosa cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 181: 98–108.

Ginther OJ, Kot K (1994) Follicular Dynamics during the ovulatory season in goats. 42: 987–1001.

Gnanaprakasam MS, Gupta PD; Talwar GP (1976) Ontogenesis, distribution and relative sensitivity of hCG receptors to hCG and LH in goat ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology** 6: 81–90.

Hervé V, Roy F, Bertin J, Guillou F, Maurel MC (2004) Antiequine Chorionic Gonadotropin (eCG) Antibodies Generated in Goats Treated with eCG for the Induction of Ovulation Modulate the Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Bioactivities of eCG Differently. **Endocrinology** 145: 294–303.

Jiang YF, Hsu MC, Cheng CH, Tsui KH, Chiu CH (2016) Ultrastructural changes of goat corpus luteum during the estrous cycle. **Animal Reproduction Science** 170: 38–50.

Kawate N, Yamazaki M, Tamada H, Inaba T, Sawada T (2002) Effect of Low Dose of hCG on Induction of Fertile Estrus in Shiba Goats Pretreated Intravaginally with Progesterone during the Early Postpartum Nursing Period. **Journal of Reproduction and Development** 48:497–504.

Mcclellan MC, Dieckman MA, Abel JH. Niswender GD (1975) Luteinizing hormone, progesterone and the morphological development of normal and superovulated corpora lutea in sheep. **Cell and tissue research** 164:291–307.

Medan MS, Watanabe G, Sasaki K, Groome NP, Sharawy S, Taya K. (2005) Follicular and hormonal dynamics during the estrous cycle in goats. **The Journal of reproduction and development** 51:455–463.

Medan MS, Watanabe G, Sasaki K, Sharawy S, Groome NP, Taya K (2003) Ovarian dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins, ovarian steroids, and inhibin during the estrous cycle in goats. **Biology of reproduction** 69: 57–63.

Meidan R, Levy N, Kisliouk T, Podlovny L, Rusiansky M, Klipper E (2005). The yin and yang of corpus luteum-derived endothelial cells: Balancing life and death. **Domestic Animal Endocrinology**, 29:318–328.

Menchaca A, Miller V, Salveraglio V, Rubianes E (2007) Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the Short-Term Protocol to synchronize ovulation in goats. **Animal Reproduction Science** 102:76–87.

Menchaca A, Rubianes E (2002) Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and folicular dynamics in goat. **Theriogenology** v. 57, p. 1411–1419, 2002.

Miranda-Moura MTM, Fonseca VU, Da Silva NB, Freitas MDL, Almeida OB, Rocha HADO, Papa PDC, Moura CEB (2010) Morphological features and vascularization study of caprine cyclic corpus luteum. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 30:351–357.

Murphy BD (2012) Equine chorionic gonadotrophin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction** 9:223–230.

Nogueira DM.; Cavalieri, J.; Gummow, B.; Parker, A. J (2015) Comparison of follicular dynamics and hormone profiles in boer goats examined during the breeding. **Small Ruminant Research** 125: 93–100.

Nogueira É, Nascimento BDS, Costa FLCC, Dias AM, Silva JCB, Ítavo LCV (2014) Pregnancy rate in lactating Bos indicus cows subjected to fixed-time artificial insemination and treated with different follicular growth inducers. **Revista Brasileira de Zootecnia** 43: 358–362.

O'shea JD, Cran DG, Hay MF(1980) Fate of the theca interna following ovulation in the ewe. **Cell and tissue research** 210:305–191

O'shea JD, Rodgers RJ, Wright PJ(1984) Morphometric analysis and function in vivo and in vitro of corpora lutea from ewes treated with LHRH during seasonal anoestrus. **Journal Reproduction Fertility** 72: 75–85.

O'shea JD, Rodgers RJ, Wright PJ (1986) Cellular composition of the sheep corpus luteum in the mid - and late luteal phases of the oestrous cycle. **Journal Reproduction Fertility** 76: 685–691.

Okada M, Takeuchi Y, Mori Y **Estradiol-Dependency of Sexual Behavior Manifestation at the Post-LH Surge Period in Ovariectomized GoatJournal of Reproduction and Development**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/44/1/44_1_53/_pdf>. Acesso em: 2 dez. 2018.

Ola SI, Egbunike NG. **Behavioural and morphological attributes of oestrus in West African dwarf does under different physiological states**. Disponível em: <http://www.lrrd.org/lrrd16/10/ola16075.htm>. Acesso em: 1 dez. 2018.

Oliveira MEF, Cordeiro MF, Ferreura RM, Souza SF, Pieroni JSP, Rodrigues LFS, Fonseca JF, Vicente WRR (2012) Does supplemental LH changes rate and time to ovulation and embryo yied in Santa Ines ewe treated for superovulaton with FSH plus eCG? **Ciência Rural** 42:1077–1082.

Oliveira, R. (2010) **Comportamento sexual de cabras Toggenburg durante a estação reprodutiva após luteólise natural ou induzida**. UFMG, Belo Horizonte.

Pandey AK, Ghuman SPS, Dhaliwal GS, Honparkhe M, Phogat JB, Kumar S (2018) Effects of preovulatory follicle size on estradiol concentrations, corpus luteum diameter, progesterone concentrations and subsequent pregnancy rate in buffalo cows (Bubalus bubalis). **Theriogenology** 107:57–62.

Pate JL, Johnson-Larson CJ.; Ottobre JS (2012) Life or death decisions in the corpus luteum. **Reproduction in Domestic Animals** 47:297–303.

Peng J, Xin H, Han P, Gao K, Gao T, Lei Y, Ji S, An X, Cao B (2015a) Expression and regulative function of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in the goat ovary and its role in cultured granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology** 412:104–115.

Peng J, Xin H, Han P, Gao K, Gao T, Lei Y, Ji S, An X, Cao B (2015b) Expression and regulative function of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in the goat ovary and its role in cultured granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology** 412:104–115.

Peng J Y, Gao KX, Xin HY, Han P, Zhu GQ, Cao BY (2016) Molecular cloning expression analysis, and function of decorin in goat ovarian granulosa cells. **Domestic Animal Endocrinology** 57:108–116.

Pietroski ACCA, Brandão FZ, Souza JMG, Fonseca JF (2013) Short, medium or long-term hormonal treatments for induction of synchronized estrus and ovulation in Saanen goats during the nonbreeding season. **Revista Brasileira de Zootecnia** 42:168–173.

Pugliesi G, Miagawa BT, Paiva YN, França MR, Silva LA, Binelli M (2014) 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?1. **Biology of Reproduction** 91:1–12. l

Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, Lo Y K, SHARMA SC (2018) Novel Signaling Pathways That Control Ovarian Follicular Development, Ovulation, and Luteinization 57:195-220.

Richards JS, Russell DL, Robker RL, Dajee M, Alliston TN (1998) Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. **Molecular and Cellular Endocrinology** 145: 47–54.

Rigoglio NN, Fátima, L. A.; Hanassaka, J. Y.; Pinto, G. L.; Machado, A. S. D.; Gimenes, L. U.; Baruselli, P. S.; Rennó, F. P.; Moura, C. E. B.; Watanabe, I. S.; Papa, P. C (2013) Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. **Theriogenology** 79 673–679.

Robker RL, Richards JS (1998) Hormone-Induced Proliferation and Differentiation of Granulosa Cells: A Coordinated Balance of the Cell Cycle Regulators Cyclin D2 and p27 Kip1 12:924-940.

Romano JE, Alkar A, Amstalden M (2016) Effect of copulation on estrus duration and ovulation time in goats. **Theriogenology** 85:330–334.

Romano JE, Keisler DH, Amstalden M (2018) Effect of copulation on estrus duration, LH response, and ovulation in Boer goats. **Theriogenology** 121: 62–66, 2018.

Rubianes E, Menchaca A (2003) The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Animal Reproduction Science** 78: 271–287.

Sá Filho MF, Crespilho AM, Santos JEP, Perry GA, Baruselli PS (2010) Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled Bos indicus cows. **Animal Reproduction Science** 120: 23–30.

Satterfield MC, Bazer FW, Spencer TE (2006) Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS 15) in the ovine uterus. **Biology of Reproduction** 75: 289–296.

Schams D, Berisha B (2004) Regulation of corpus luteum function in cattle--an overview. **Reproduction in Domestic Animals** 39:241–251.

Senger P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2. ed. [s.l: s.n.]

Siqueira AP, Fonseca JF, Silva Filho JM, Bruschi JH, Viana JHM, Palhares MS, Bruschi MCM, Peixoto MP (2009) Parâmetros reprodutivos de cabras Toggenburg inseminadas com sêmen resfriado, após diluição em meio à base de gema de ovo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 61:299–305.

Smith MF, Mcintush WE, Smith WG (1994) Mechanisms associated with corpus luteum development. **Journar Animal Science** 72:1857–1872.

Sousa LMMC, Mendes GP, Campos DB, Baruselli OP, Papa C (2016) Equine chorionic gonadotropin modulates the expression of genes related to the structure and function of the bovine corpus luteum. **Plos One** 1–24.

Souza RS, Barbosa LP, Aguiar CS, Figueredo J, Ribeiro M, Mendes CS, Almeida VF, Araújo RCSA, Pinheiro AM, Marques JÁ (2011) Sincronização da ovulação utilizando FSH em substituição à eCG em cabras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia** 63:753–756.

Spencer TE, Forde N, Lonergan P (2015) The role of progesterone and conceptus derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. **Journal Dairy Science** 99: 5941–5950.

Stocco C, Telleria C, Gibori G (2007) The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. **Endocrine Reviews** 28:117–149.

STOUFFER, R. L. **Physiology of Reproduction**. 3th. ed. [s.l: s.n.]

SUGINO N (2014) Molecular mechanisms of luteinization. **Obstetrics & Gynecology Science 5**7:93 - 101.

Tortorella RD, Ferreira R, Santos JT, Neto OSA, Barreta MH, Oliveira JF, Gonçalves PB, Neves JP (2013) The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. **Theriogenology** 79: 1204–1209.

Urrutia-Morales J, Meza-Herrera CA, Escobar-Medina FJ, Gamez-Vazquez HG, Ramirez-Andrade BM, Diaz-Gomez MO, Gonzalez-Bulnes A (2009) Relative roles of photoperiodic and nutritional cues in modulating ovarian activity in goats. **Reproductive Biology** 3:283–94.

Vázquez MI, Blanch MS, Alanis GA, Chaves MA, Gonzalez-Bulnes A (2010) Effects of treatment with a prostaglandin analogue on developmental dynamics and functionality of induced corpora lutea in goats. **Animal Reproduction Science** 118: 42–47.

Vrisman, DP, Bastos NM, Rossi GF, Rodrigues NN, Borges LPB, Taira AR, DE Paz CCP, Nogueira G de P, Teixeira PPM, Monteiro FM, Oliveira MEF (2017) Corpus luteum dynamics after ovulation induction with or without previous exposure to progesterone in prepubertal Nellore heifers. **Theriogenology** 106:60–68.

Wiltbank MC, Salih SM, Atli MO, Luo W, Bormann CL, Ottobre JS, Vezina CM, Mehta V, Diaz FJ, Tsai SJ, Sartori R (2012) Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. **Animal reproduction / Colegio Brasileiro de Reproducao Animal** 9:242–259.