

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITOS DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NO TECIDO
LUTEAL APÓS SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO COM DUAS DOSES
DE PROSTAGLANDINA COM INTERVALOS DISTINTOS EM
OVELHAS MORADA NOVA**

Renata Kelly Trindade Aleixo

Médica Veterinária

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITOS DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NO TECIDO
LUTEAL APÓS SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO COM DUAS DOSES
DE PROSTAGLANDINA COM INTERVALOS DISTINTOS EM
OVELHAS MORADA NOVA**

Renata Kelly Trindade Aleixo

Orientadora: Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira

Coorientador: Dr. Rui Machado

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, área: Reprodução Animal.

2024

A366e

Aleixo, Renata Kelly Trindade

Efeitos da gonadotrofina coriônica humana no tecido luteal após sincronização do estro com duas doses de prostaglandina com intervalos distintos em ovelhas Morada Nova / Renata Kelly Trindade Aleixo. -- Jaboticabal, 2024

56 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Maria Emilia Franco Oliveira

Coorientadora: Rui Machado

1. Reprodução. 2. Ovinos. 3. Cloprostenol. 4. hCG. 5. Ultrassonografia. I.

Título.

Impacto potencial desta pesquisa

Estudos com as biotecnologias reprodutivas em ovelhas ajudam a fortalecer a produção animal, podendo reduzir custos e impulsionar a sustentabilidade no campo, além de ampliar as bases genéticas e contribuir para as pesquisas científicas futuras. O fortalecimento da produção animal abrange o melhoramento genético e a eficiência produtiva, permitindo que os produtores selecionem características desejáveis para o seu rebanho, melhorando a produtividade de forma sustentável e o aumento no rendimento da produção. Além de controlar e otimizar o ciclo reprodutivo, facilitando o manejo, aumentando os sucessos nas taxas de gestação e a concentração dos nascimentos em períodos estratégicos, favorecendo os cuidados com a vida e bem-estar dos cordeiros. Pesquisas acerca das biotecnologias em ovelhas geram conhecimento e aplicabilidade das técnicas desenvolvidas à outras espécies, contribuindo para a preservação de raças, espécies e da biodiversidade.

Potential impact of this research

It is expected that studies with reproductive biotechnologies in sheep will help strengthen animal production, reducing costs and boosting sustainability in the field, as well as expanding genetic bases and contributing to future scientific research. The strengthening of animal production encompasses genetic improvement and production efficiency, allowing producers to select desirable traits for their herd, improving productivity in a sustainable way and the increase in production yield. In addition, it controls and optimizes the reproductive cycle, facilitating management, increasing successes in pregnancy rates and the concentration of births in strategic periods, favoring the care of the life and well-being of lambs. Research on biotechnologies in sheep generates knowledge and applicability of the techniques developed to other species, contributing to the preservation of breeds, species and biodiversity.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NO TECIDO LUTEAL APÓS SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO COM DUAS DOSES DE PROSTAGLANDINA COM INTERVALOS DISTINTOS EM OVELHAS MORADA NOVA

AUTORA: RENATA KELLY TRINDADE ALEIXO
ORIENTADORA: MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA
COORIENTADOR: RUI MACHADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Veterinárias, área: Morfofisiologia e Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente
MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA
Data: 30/09/2024 09:25:24 -0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reproducao e Saude Unica / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente
FABIO MORATO MONTEIRO
Data: 30/09/2024 09:10:38 -0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisador Dr. FABIO MORATO MONTEIRO (Participação Virtual)
Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP

Prof. Dr. MILLER PEREIRA PALHÃO (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Federal de Lavras (UFLA) - Lavras/MG



Documento assinado digitalmente
MILLER PEREIRA PALHAO
Data: 27/09/2024 18:35:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 29 de julho de 2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Renata Kelly Trindade Aleixo, nasceu em Belém do Pará. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) em 2020. Possui treinamento e foi bolsista extensão durante o período de 2017, 2018 e 2019 pela UFRA, na área de produção e reprodução de pequenos ruminantes. Foi membro efetivo, sendo diretora de extensão da Liga Acadêmica de Patologia Veterinária pela UFRA, de 2017 a 2019. Em 2019, realizou estágio supervisionado obrigatório na área de produção e reprodução de ovelhas leiteiras na propriedade Rima. Pertenceu ao Programa de Residência Multiprofissional em Medicina Veterinária com ênfase em Reprodução Animal da UFRA (2020 – 2022). Em 2022, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Reprodução Animal pela Universidade Estadual Paulista (UNESP, campus Jaboticabal) como bolsista Capes, sob orientação da Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira e coorientação do pesquisador Dr. Rui Machado.

Dedico

à minha família, em especial, à minha
mãe, nossa base.

Agradecimentos

Agradeço a todos os seres divinos que intercederam por mim durante este processo. Agradeço grandemente à minha família que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, bons e ruins. Agradeço, em especial, a minha mãe Maria e ao meu irmão Ivan, amores de uma vida toda, exemplos de ser humano, de bondade e empatia, vocês são incríveis e agradeço por tê-los em minha vida. A minha Vó “preta” que tanto me orgulha por seus ensinamentos, histórias e superações que teve que lidar. E a todos aqueles que se fizeram presente na vida de vocês e que foram apoio enquanto estive fora.

Agradeço a minha cadelinha Juli, que é o amor da minha vida, que me acompanhou por longos, lindos e incríveis 15 anos. Julica foi uma companheira incrível, que foi destinada a ser minha desde o momento que a gente se encontrou, em uma praça de Belém, estando vestida de mamãe Noel, no dia 23 de dezembro de 2007, querendo ser adotada. Te ter em minha vida foi a melhor escolha, te escolheria outras milhares de vezes para me dar mordidinhas na hora de dormir, para me fazer ser tua veterinária particular todos os dias, para ter todos aqueles sustos que você deu diversas vezes. Ter que te deixar foi a pior decisão que tive que tomar e o fato de você não ter me esperado para se despedir dói até hoje, uma dor carregada de culpa, mas também de alívio, porque sei que estava sendo difícil lidar com aquela doença crônica que tanto te deixou mal e agora, meu amor, tu podes descansar, livre de qualquer dor ou desconforto. Em todos os momentos que sinto medo ou receio durante este processo, sempre lembro de ti e consigo seguir, porque nada poderá ser em vão. Te amo para sempre, minha Diuca.

À Darwin, que incrivelmente nos deixou tão precocemente, nos mostrando o cuidado, paciência e o quanto a saudade pode afetar uma vida. Darwinha, você foi uma gatinha incrível, ter perdido você logo após a Julica, foi devastador para todos nós. A gente esperava te encontrar na volta com muita saúde, esbanjando medo, pois os dias que viveu nas ruas te fez temer a presença humana. Te conquistar foi um trabalho difícil, mas quase concluído, se não fosse tua partida inesperada. Onde quer que esteja, saiba que te amamos muito, te amaríamos por mais outras vidas também. Estamos

agora cuidando da tua irmãzinha Gumball. Sentiremos para sempre tua falta, Darwin e obrigada por tanto.

Aos nossos queridos amigos e veterinários excepcionais Bianca, Drico, Camila, Bibi, Lucian, Vitor e Karol, que nos socorreram quando mais precisávamos, dando suporte e apoio às nossas filhas nestes momentos difíceis. Contar com o apoio de vocês foi mais do que essencial. Obrigada a todos.

Ao Christian, meu companheiro incansável, que ficou ao meu lado durante todo o processo, sendo parceiro de vida e de pesquisa. Foi essencial para que grande parte deste trabalho pudesse ser concluído, sendo parceiro e amigo nos momentos mais difíceis, sendo o acalanto que precisei diversas vezes. Aos nossos gatos, Slash e Slip, que foram nossos “companheiros dos dias difíceis”, nos ensinaram e ensinam tanta coisa, foram fundamentais para atenuar a saudade de casa, dos nossos outros pets que não puderam ir conosco. Adotar essas “quianças” foi um acerto e divino, certamente. Amo tanto vocês três. Ao seu Arthur, dona Kátia, Thiago, Karina e Eva, por todo apoio conosco neste momento. A todos os amigos, primos da família que também nos ajudaram.

Agradecer aos amigos de Jaboticabal, em especial a Aninha, Brenda, Priscila e Sosô. Foi bom demais contar com a presença e ajuda de vocês, de partilhar bons momentos, conversas, rotina, trabalhos e ainda matar a saudade de casa, pois todos nortistas, todos entre amigos. Amo vocês. Agradecer ao Gabriel e Joedson pelos ensinamentos prestados, apoio e ajuda com a pesquisa. Foram essenciais.

Agradeço a Lívia, Giovanna e Maria por me receberem em São Carlos. Contar com esse apoio foi mais do que fundamental para que a pesquisa pudesse ser realizada. A todos os funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste que me receberam de braços abertos e ajudaram em todo o processo, especialmente, ao Rafael, Tadeu e Juliana, aos estagiários, em especial a Carol, que tanto contribuíram para que a atividade pudesse acontecer todos os dias, sem falhas.

Ao Dr. Rui que foi um exímio coorientador, estando na rotina, acompanhando todo o processo, sempre atento a todos os detalhes. Seu apoio e orientação foram essenciais. Agradeço especialmente a Médica Veterinária Verônica que foi além de

essencial. Verônica foi essencial no processo de pesquisa e principalmente nos momentos de prática, com dicas úteis, sempre atenta também a todas as atividades. Vê, você foi mais do que incrível, mulher, levarei essas lembranças e todos os ensinamentos para sempre.

À minha orientadora pela oportunidade de realizar este sonho que é o mestrado. Orientando sempre da melhor maneira, sendo gentil e tão delicada. Obrigada pelos ensinamentos e pela oportunidade.

Ao Programa de Pós - Graduação da Unesp/FCAV e a capes, pela concepção da bolsa.

E a todos que contribuíram de alguma forma para que tudo pudesse ocorrer da melhor maneira possível. Agradeço grandemente.

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

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Corpo Lúteo e manutenção da gestação em ovelhas	2
2.2. Prostaglandina F2- alfa (PGF2 α): Características fisiológicas e utilização em protocolos de sincronização do estro.....	4
2.3. Gonadotrofina Coriônica Humana: características gerais	9
3.REFERÊNCIAS.....	12
CAPÍTULO 2 - Efeitos da gonadotrofina coriônica humana na prenhez e nos indicadores da função luteínica de ovelhas Morada Nova após sincronização do estro com prostaglandina	1
1 Introdução	1
2 Material e métodos	3
<i>Ética e Local do experimento</i>	3
<i>Animais</i>	3
<i>Ciclicidade das fêmeas e aptidão reprodutiva dos machos</i>	3
<i>Sincronização do estro</i>	4
<i>Monta natural</i>	4
<i>Tratamento com hCG</i>	5
<i>Avaliações ultrassonográficas dos ovários e diagnóstico de gestação</i>	5
<i>Análises estatísticas</i>	7
3 Resultados.....	8
4 Discussão	9
5 Conclusão	13
6 Referências	14



CERTIFICADO
CEUA PRT Nº 04/2023

Certificamos que o projeto de Pesquisa intitulado: “Estratégias para sincronização de estro em ovelhas receptoras de embriões”, registrado com o número 20.22.03.004.00.02.013, sob responsabilidade do pesquisador científico Dr. Rui Machado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Pecúária Sudeste.

(We hereby declare that the research project titled “Strategies to estrus synchronization in embryo recipient ewes” has been registered under the responsibility of Dr. Rui Machado (number 20.22.03.004.00.02.013) involving production, management or utilization of animals from phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans). The described experimental protocol is in accordance to the Brazilian Federal Law on Animal Experimentation (#11.794, enacted on 8th October 2008), to the Decree 6.899 (enacted on 15th July 2009) and the corresponding rules of National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and it was approved by the Committee of Animal Experimentation of Embrapa Southeast Livestock.)

São Carlos, 28 de Setembro de 2023.

Dra Simone Cristina Méo Niclura
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Pecúária Sudeste

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	18/09/2023 a 17/08/2025
Espécie / Linhagem / Raça	Ovinos / Ovis aries / Morada Nova
Número de Animais	214
Peso / Idade	> 25 kgs / > 18 m
Sexo	12 Machos e 192 Fêmeas
Origem	Embrapa Pecúária Sudeste

EFEITOS DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NO TECIDO LUTEAL APÓS SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO COM DUAS DOSES DE PROSTAGLANDINA COM INTERVALOS DISTINTOS EM OVELHAS MORADA NOVA

RESUMO - O objetivo deste estudo foi avaliar protocolos de sincronização do estro com duas aplicações de 150µg de cloprostenol sódico (análogo da PGF2α) com intervalos de 7,5 ou 11,5 dias, associados ou não a estimulação gonadotrófica com 300 UI de hCG administrada 7,5 dias após a 2ª aplicação de PGF2α em fêmeas Morada Nova na primavera. Oitenta e oito ovelhas cíclicas receberam 150 µg de cloprostenol sódico em um dia aleatório do ciclo estral. Uma segunda dose aplicação foi realizada 7,5 (G_{PG - 7,5} n= 44) ou 11,5 (G_{PG - 11,5} n= 43) dias após a primeira aplicação. vinte e quatro horas após, as fêmeas foram submetidas à monta natural noturna em arena por três noites (das 18h30min às 06h30min) consecutivas. Sete e meio dias depois da 2ª aplicação de PGF2α, as ovelhas foram redistribuídas em dois tratamentos, metade delas (n= 43) recebeu 1mL de solução salina e a outra metade (n= 44) recebeu 300 UI de hCG. Deste modo, formaram-se os seguintes grupos: G_{PG - 7,5sal}; G_{PG - 11,5 sal}; G_{PG - 7,5 hCG} e G_{PG - 11,5 hCG}. Foram feitas ultrassonografias seriadas desde a aplicação da hCG até o diagnóstico de prenhez, realizado 30 dias depois das montas noturnas. A taxa de prenhez não diferiu (p> 0,05) entre os grupos. O tempo entre a 2ª aplicação e a manifestação do estro foi menor (p< 0,05) para o G_{PG - 7,5} (G_{PG - 7,5sal}; G_{PG - 7,5 hCG}), embora não tenha ocorrido diferença entre os grupos no número de ovulações após a sincronização do estro. O número de CL ao longo da fase lútea foi maior (p< 0,05) para as ovelhas do G_{PG - 7,5 hCG}. Por sua vez, o G_{PG - 7,5sal} teve os menores valores numéricos (p< 0,05) para volume, área e diâmetro do corpo lúteo, bem como os indicadores da sua vascularização, com efeitos independentes entre si. Conclui-se que os protocolos de sincronização com duas aplicações de PGF2α em intervalos de 7,5 ou 11,5 são eficazes para uso em ovelhas Morada Nova acasaladas na primavera da região Sudeste do Brasil. Além disso, esses protocolos podem ser administrados de forma simultânea, de modo a favorecer a adoção da monta noturna e otimizar o uso de reprodutores e a suplementação com hCG favorece o aumento no número de corpos lúteos.

Palavras – chave: Biometria luteal; Corpo lúteo; hCG; Perfusão sanguínea luteal; Ovinos.

EFFECTS OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN IN LUTEAL TISSUE AFTER SYNCHRONIZATION OF ESTRUS WITH TWO DOSES OF PROSTAGLANDIN WITH DISTINCT INTERVALS IN MORADA NOVA SHEEP

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate estrus synchronization protocols with two applications of 150µg sodium cloprostenol (analog of PGF2α) at intervals of 7.5 or 11.5 days, associated or not with gonadotrophic stimulation with 300 IU hCG administered 7,5 days after the 2nd application of PGF2α in females Morada Nova in spring. Eighty-eight cyclic ewes received 150 µg of cloprostenol sodium on a random day of the estrous cycle. A second dose was applied 7.5 (G_{PG - 7.5} n = 44) or 11.5 (G_{PG - 11.5} n = 43) days after the first application. Seven and a half days after the 2nd application of PGF2α, the sheep were redistributed in two treatments, half of them (n = 43) received 1mL of saline solution and the other half (n = 44) received 300 IU of hCG. Thus, the following groups were formed: G_{PG - 7.5sal}; G_{PG - 11.5 sal}; G_{PG - 7.5 hCG} and G_{PG - 11.5 hCG}, twenty-four hours later, the females were submitted to natural night riding in arena for three consecutive nights (from 18h30min to 06h30min). Serial ultrasonographs were performed from the application of hCG until the diagnosis of pregnancy, carried out 30 days after the night rides. The pregnancy rate did not differ (p > 0.05) between groups. The time between the 2nd application and estrus manifestation was lower (p < 0.05) for G_{PG - 7.5}, although there was no difference between the groups in the number of ovulations after estrus synchronization. The number of CL during the luteal phase was higher (p < 0.05) for the G_{PG - 7.5 hCG} sheep. In turn, the G_{PG - 7.5sal} had the lowest numerical values (p < 0.05) for volume, area and diameter of the corpus luteum, as well as the indicators of its vascularization, with independent effects between themselves. It is concluded that the synchronization protocols with two applications of PGF2α at intervals of 7.5 or 11.5 are effective for use in Morada Nova sheep mated in the spring of the Southeast region of Brazil. In addition, these protocols can be administered simultaneously to promote the adoption of nocturnal breeding and optimize the use of breeding stock, and supplementation favors an increase in the number of corpora lutea.

Keywords: Corpus luteum; Luteal biometrics; Luteal blood perfusion; hCG; Ovine.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Os ovinos Morada Nova são uma das principais raças nativas da região Nordeste do Brasil (Facó et al., 2008). Essas ovelhas são caracterizadas por serem deslanada e terem pequeno porte, rusticidade, adaptabilidade, altas taxas de prolificidade, fertilidade, precocidade reprodutiva e boa habilidade materna (Facó et al., 2008; Sousa et al., 2015). Em geral, a espécie ovina é classificada como poliéstrica estacional de dias curtos. No entanto, tem sido reportado que as fêmeas da raça Morada Nova, podem ser consideradas poliéstricas contínuas, apresentando estro, ovulação e parição ao longo de todo o ano (Haus de Souza et al., 2006).

A reprodução de ovelhas pode ser controlada por diversos métodos que envolvem a administração de hormônios e métodos “naturais” como o de exposição a luz controlada ou a um reprodutor (“efeito macho”) (Abecia et al., 2012). A sincronização do estro e da ovulação é uma ferramenta importante para a intensificação dos rendimentos reprodutivos, permitindo melhor controle e eficiência na produção ovina (Contreras-Solis et al., 2009). Essa ferramenta se torna indispensável na adoção das tecnologias de reprodução assistida como a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) ou Múltiplas Ovulações e Transferência de Embriões (MOTE) (Menchaca et al., 2005; Falchi et al., 2022).

Protocolos de sincronização contendo prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) ou seus análogos, apresentam-se como uma promissora estratégia em propriedades que visam racionalizar o manejo animal (Maia et al., 2017). Esses protocolos podem ser em dose única ou dupla. Neste caso com intervalos distintos, desde 7 até 11,5 dias (Tabela 1.) (Menchaca; Rubianes, 2004). A avaliação dos efeitos da indução do estro com progestágenos ou análogos da PGF_{2α} na função ovariana e hipofisária de ovelhas foi realizada por Letelier et al. (2011). Eles concluíram que a utilização da PGF_{2α} (e seus análogos) é uma boa alternativa de implementação, pois apresentou valores como comportamento do estro superior as tratadas com progestágeno, além

de proporcionar uma maior produção de progesterona (P4), no entanto, a literatura não é unânime a esse respeito. Godfrey et al. (1999) e Fierro et al. (2011) contrapõem aqueles achados, pois reportaram menor produção de P4, menor número de ovulações e concepção, prolificidade e fecundidade mais baixas com o uso de PGF2 α quando comparado aos protocolos com progesterona (ou progestágenos).

Estratégias que aumentam os níveis circulantes de P4 e a taxa de concepção em ovelhas e cabras pelo uso de agentes luteotróficos como a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) vem sendo desenvolvidas (Khan et al., 2009; Fonseca et al., 2018), aumento na quantidade de CL tem sido repetidamente reportado devido à formação de CL acessório (CLa) em ovelhas (Coleson et al., 2015; Vergani et al., 2020; Gonçalves et al., 2024). Esse achado foi relacionado com a formação de CLa, aumento da área e peso luteal, além de aumento na vascularização do CL original (CLo) e consequente aumento nos níveis circulantes de P4 (Kittok et al., 1983; Gamboni et al., 1984; Farin et al., 1988; Nephew et al., 1994; Catalano et al., 2015; Coleson et al., 2015; Azari et al., 2020; Vergani et al., 2020; Rodrigues et al., 2022).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Corpo Lúteo e manutenção da gestação em ovelhas

O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina temporária responsável pela produção de P4, hormônio essencial para a manutenção da prenhez e regulação do ciclo reprodutivo, marcando a fase lútea que ocorre do 3^o ou 4^o ao 15^o dia do ciclo estral em ovelhas (Pate et al., 2023). O processo de formação do corpo lúteo, denominado luteogênese, inicia-se no folículo ovulatório e envolve mudanças morfológicas, endócrinas e enzimáticas (Smith et al., 1999).

A formação do CL é dependente do pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH), momento que ocorre o aumento da expressão dos receptores de LH (LHR) e o processo de luteinização das células da granulosa que são convertidas em células esteroidogênicas luteais grandes (LLCs) e a diferenciação das células da teca em

células luteais pequenas (SLCs), especialmente em folículos ovulatórios, resultando na formação do CL maduro (Sullivan et al., 2013; Wiltbank et al., 2023).

As principais características do desenvolvimento luteal são a intensidade do processo de vascularização altamente ativo e de repetidas mitoses em células esteroidogênicas que estão relacionadas com a capacidade de produzir P4, fatores de crescimento e fatores angiogênicos dentro do CL (Acosta; Miyamoto, 2004). Essas alterações permitem alto fluxo de nutrientes, oxigênio e substratos que irão otimizar a função lútea e a produção da progesterona, evidenciando as características morfológicas e funcionais do corpo lúteo (Wiltbank et al., 2023).

No exame ultrassonográfico, o CL em sua fase inicial pode ser visualizado de três a cinco dias após a ovulação (Duggavathi et al., 2003; Simões et al., 2007; Figueira et al., 2015), como uma estrutura de contorno irregular, de ecogenicidade hipoecoica e ecotextura heterogênea, com ou sem cavidade, e quando atinge o meio do ciclo, passa a apresentar contorno regular, com demarcação evidente entre o CL e o estroma ovariano, ecotextura com aspecto granular, estando correlacionados positivamente com as concentrações circulantes de P4 (Veronesi et al., 2002; Simões et al., 2007). Na regressão luteal ou luteólise há perdas destas características, com diminuição gradativa da área e vascularização luteal como demonstrado por Figueira et al. (2015).

Durante a fase inicial da gestação é necessária uma comunicação bioquímica eficiente entre o concepto e a unidade materna no ambiente uterino para que não ocorra o processo de luteólise e a interrupção da produção de P4 pelo CL (Marques et al., 2007). Essa comunicação é denominada reconhecimento materno da prenhez e envolve a ocorrência de mecanismos moleculares durante o alongamento do concepto em ruminantes. Esses mecanismos regulam o interferon-tau (IFNT), emitindo sinais antiluteolíticos que agem de maneira parácrina no endométrio, impedindo a síntese dos receptores de ocitocina (OTR) e a liberação pulsátil de PGF2 α endometrial nos dias 13 a 21 da gestação, responsáveis pela luteólise em fêmeas não prenhes (Spencer et al., 1996; Wiltbank et al., 2023).

Os mecanismos moleculares ocorrem no momento de pré-implantação do concepto bovino e ovino e, incluem transporte de glicose, proliferação celular, migração e fixação, síntese de proteases e seus inibidores, enzimas intracelulares e

fatores de transcrição, importantes para o sucesso do estabelecimento da gestação (Bazer et al., 2018). Além disso, e como já mencionado, o alongamento do concepto maximiza a produção do IFNT e permite a expansão da área de superfície placentária que é necessária para a implantação em ruminantes (Jia et al., 2023). Silver. (1994) evidenciou que a placenta ovina secreta quantidades crescentes de P4 entre os dias 55 e 60 de prenhez, não demonstrando ser corpo lúteo dependente durante toda a gestação, como é observado em cabras.

Perdas gestacionais em ovelhas foram estimadas por Bolet. (1986) desde os estágios iniciais até o parto. Esse autor reportou perdas de 30% no período de pré-implantação embrionária. As perdas do dia 25 até o dia do parto diminuíram à medida que as concentrações de P4 aumentavam (Dixon et al., 2007). Portanto, compreender os mecanismos que envolvem processos de formação do CL, protocolos e estratégias que possam melhorar a qualidade funcional e estrutural desta glândula temporária são indispensáveis para o sucesso na gestação e aumento na produtividade de ovelhas.

2.2 Prostaglandina F2- alfa (PGF2 α): Características fisiológicas e utilização em protocolos de sincronização do estro

A luteólise ou regressão do CL promove declínio da secreção de progesterona (P4), fenômeno que marca a luteólise funcional. A seguir decorrer a mudança estrutural celular do espaço físico referente ao CL (Miyamoto et al., 2009), a qual se caracteriza pela perda dos componentes da integridade celular, devido a redução do suprimento vascular, proliferação do tecido conjuntivo, aumento da desorganização celular, degeneração e fagocitose das células luteais. Essas alterações ocorrer por volta do 13^o e 17^o dia do ciclo estral das ovelhas (Fonseca, 2005; Fierro et al., 2013).

Há estudos da ação luteolítica da prostaglandina (PGF2 α) em ovelhas desde a década de 1970, em que se demonstrou que a PGF2 α é liberada no útero destas fêmeas de maneira cíclica (MCCracken et al., 1970). A atividade luteolítica ocorre localmente nos ovários por meio de mecanismos contracorrente e fisiológicos

promovendo a inibição da esteroidogênese, alterações vasculares, alterações nas populações imunológicas luteais e indução do apoptose no final do ciclo estral (McCracken et al., 1970;McCracken, 1972; Pate; Hughes, 2023).

A responsividade do CL às ações luteolíticas da PGF2 α é observada nos dias 3 e 5 após a ovulação (Rubianes et al., 2003). A refratariedade luteal, ou seja, a não responsividade à ação luteolítica da prostaglandina ocorre na fase inicial da vida do CL e durante o período gestacional para impedir a luteólise, devido a atividade das prostaglandinas luteotrópicas (prostaciclina – PGEI2 e prostaglandina E2 – PGE2), pois antagonizam os feitos luteolíticos (Silva et al., 2000; Fierro et al., 2013).

A administração de uma dose do análogo da PGF2 α entre os dias 3, 5 e 14 do ciclo estral (D0= estro) de ovelhas pode induzir a uma rápida regressão luteal, com declínio da P4 (<1ng/mL) 24 horas após o tratamento, resultando no retorno ao estro seguido da ovulação (Acritopoulou; Haresing, 1980; Rubianes et al., 2003). Esta resposta irá depender do status ovariano individual de cada fêmea no momento da administração, promovendo variabilidade no tempo de ocorrência do estro e da ovulação (Viñoles & Rubianes, 1996). Se no momento da administração da PGF2 α um folículo em crescimento estiver presente, ele continuará se desenvolvendo e o estro e ovulação ocorrerão de maneira precoce, logo após o tratamento, enquanto se o folículo estiver em regressão é necessário um novo folículo em crescimento, seguido de estro e ovulação mais tardiamente (Menchaca & Rubianes, 2004).

A restrição do uso de protocolos com progestágenos e estradiol (17- β estradiol) na reprodução de ruminantes, nos países da União Europeia e nos EUA, estimulou a utilização da PGF2 α em protocolos de sincronização de estro em ovelhas cíclicas (Menchaca & Rubianes, 2004; Cxm 2-2023). Os análogos sintéticos e doses de prostaglandina são variados para o controle do ciclo estral de pequenos ruminantes (Fierro et al., 2013). Os protocolos podem ser em dose única ou com duas doses com intervalos distintos, conforme demonstra a tabela 1. Após a administração em dose única de um análogo da PGF2 α nos dias cinco, oito e 11 do ciclo estral de ovelhas, foi observado diferença no número do primeiro e segundo maior folículo ovulados, sendo superior para aquelas que receberam a dose no dia cinco do ciclo estral, sem diferença no número de ovulações, mas todas apresentaram maior número de folículos pequenos (\leq 2 e 3 mm) (Houghton et al., 1995).

Fierro et al. (2011) avaliaram os efeitos da administração da prostaglandina com intervalo de sete dias na dinâmica folicular ovariana de ovelhas e constataram que as fêmeas tratadas apresentaram folículos maiores (5,2 x 4,0 mm), com tendência a maior taxa de crescimento por dia, sem associação a uma maior capacidade esteroidogênica, pois apresentou níveis séricos de P4 e estradiol semelhantes ao grupo controle, com taxa de ovulação e fertilização sem diferença estatística ($p > 0,05$), mas com taxa de recuperação, qualidade embrionária inferiores e maior tendência de perdas embrionárias aos 30 dias de gestação para o grupo tratado com o análogo da $PGF2\alpha$, comparadas com ovelhas em estro espontâneo (grupo controle).

Olivera-Muzante et al. (2011) compararam o desempenho reprodutivo de ovelhas tratadas com o protocolo Synchrovine® (duas doses de 125 µg i.m, sete dias) e com o protocolo tradicional de P4-Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG), (MAP= 60 mg de medroxiprogesterona, 13 dias, e 300 Unidades Internacionais (UI) de eCG), observaram taxas de fertilidade e fecundidade superiores para o grupo P4-eCG, taxa de prolificidade semelhante entre os grupos e perdas superiores para o grupo tratado com o protocolo Synchrovine®, independente do tempo de inseminação artificial (IA), característica do sêmen (fresco ou resfriado) e via de IA (cervical ou intra-uterina), em contrapartida, quando protocoladas com intervalos intermediários ou longos (9, 14, 15 e 16 dias) podem apresentar efeitos semelhantes ao protocolo P4-eCG (Fierro et al., 2017; Hajibemani et al., 2022).

A qualidade do CL de ovelhas sincronizadas com $PGF2\alpha$ pode ser inferior quando comparada com protocolos que contém pregestágenos e eCG. Portanto, melhorar o protocolo com agentes luteotróficos após a sincronização pode ser uma possibilidade para aumentar a qualidade e eficiência dos protocolos de sincronização do estro baseados no uso de prostaglandinas.

Tabela 1. Principiais análogos da PGF2 α , doses e intervalos utilizados nos protocolos de sincronização do estro, com intervalo até o estro e taxa de prenhez em ovelhas.

Análogo	Dose	Intervalo*	Intervalo até estro (h)**	Taxa de prenhez (%)	Referências
Cloprostenol	100 μ g i.m	Dose única	37,4	.	(Acritopoulou et al., 1980)
Dinoprost	5 mg i.m	Dose única	36 a 48	.	(Houghton et al., 1995)
Delprostenato	160 μ g i.m	Dose única	39 a 48	.	(Rubianes et al., 2003)
Delprostenato	160 μ g i.m	7 dias	25 a 48	37	(Menchaca et al., 2004)
Cloprostenol	100 μ g i.m	10 dias	.	70,6	(González-Bulnes et al., 2005)
Cloprostenol	126 μ g i.m	9 dias	28,6 e 40,4	.	(Contreras-solis et al., 2009)
DL-cloprostenol	125 μ g i.m	7 dias	.	63	(Fierro et al., 2011)
Cloprostenol sódico	0,48 mg i.m	7 dias	36,1	.	(Teixeira et al., 2016)
Delprostenato ou D-cloprostenol	160 ou 75 μ g i.m	7 dias	49,2	37,9 e 45,7	(Vilariño et al., 2017)
Cloprostenol	120 μ g i.m	7, 9 e 11,5 dias	36,5, 45,8 e 43,7	66,7, 71,0 e 711,0	(Almeida et al., 2018)
D-cloprostenol	75 g i.m	9 dias	44,8	83,3	(Hajibemani et al., 2023)

μ g= micrograma; i.m= intramuscular; mg= miligrama; * Intervalo entre os dias de aplicação das doses e **Intervalo até o estro após a segunda dose de PGF2 α nos protocolos que utilizaram duas doses.

2.3 Gonadotrofina Coriônica Humana: características gerais

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é um hormônio glicoproteico, assim como o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH) (Pierce et al., 1981). A hCG é produzida pelas células sinciotrofoblásticas placentárias fundidas e diferenciadas a partir da terceira semana de gestação em mulheres. Ela substitui o LH hipofisário, hormônio que promove a produção de P4 pelas células do CL, cujo pico de produção é por volta da 10^a semana de gestação, mas continua sendo produzida até o termo (Cole, 2009; Cole, 2012).

Compreende-se que a hCG é heterodímera, composta por duas subunidades, a subunidade- α e subunidade- β (Cole, 2012). A subunidade- β da hCG possui similaridade com a subunidade- β do LH, com 80% de homologia sequencial, responsáveis por sinalizarem um receptor comum LHR/hCG, expresso nas células da teca, células intersticiais, células diferenciadas da granulosa e células lúteas nos ovários, nas células de Leydig dos testículos, tecido mamário e útero, que contribui para a hCG exercer diversas funções biológicas, especialmente, durante a fase inicial da gestação em mulheres (Cole et al., 1991; Ascoli et al., 2002).

As funções biológicas ocorrem devido a presença dos receptores de LH/hCG nas células do trato reprodutivo, cujas funções são a produção de P4, a decidualização placentária na comunicação entre o blastocisto e tecido miométrial para o crescimento simultâneo do feto e o relaxamento da musculatura, a angiogênese uterina e do cordão umbilical, o crescimento e diferenciação dos órgãos fetais (Lei et al., 1992; Kornyei et al., 1993; Cole, 2010). A distribuição dos LHRs e sua função em tecidos extra gonadais em várias espécies são descritos por (Fields; Shemesh, 2004), que reportam a distribuição dos receptores no oviduto, endométrio, útero intacto, miométrio, vasos sanguíneos uterinos e cérvix no bovino, coelho, humano, suíno, rato e peru, promovendo aumento da contração, aumento do relaxamento, aumento do fluxo sanguíneo, neovascularização e de segundo mensageiros, evidenciando ação além daquela observada no CL destas espécies.

A principal diferença entre a hCG e o LH é a meia-vida circulante, enquanto a meia-vida circulante do LH é de 25 a 30 minutos, a meia-vida circulante da hCG se estende por aproximadamente 37 horas (Cole, 2010). Sua via de

eliminação ocorre através do fígado e rins, 78% e 22% do total da hCG, respectivamente (Nisula et al., 1989). Mock et al. (1983) observaram que a célula lútea ovina degrada a hCG e o LH em 22,8 e 0,4 horas (h), respectivamente. Em vacas tratadas com hCG, notou-se concentração aumentada do hormônio duas horas após início do tratamento e concentração máxima e platô de quatro a 12h, com decréscimo após 72h (Nascimento et al., 2013).

Bruno-Galarraga et al. (2021) investigou o uso de 500 UI da hCG (gonadotrofina coriônica humana) 400 UI da eCG (gonadotrofina coriônica equina) aplicadas 24 horas após a retirada do dispositivo intravaginal e administração de PGF2 α em protocolos de indução de estro e ovulação em ovelhas. A suplementação com eCG proporcionou maiores resposta em estro (100% e 61,5%), taxa de gestação de (62,2% vs. 38,5%), associada a menor ocorrência de cistos foliculares. A função luteínica não diferiu entre os grupos ($p>0,05$) e foi medida como quantidade de ovelhas com CL, número de CLs, concentração de P4. Dias et al. (2018) em trabalho similar, também já havia reportado melhor desempenho para eCG (56,7%) comparada a hCG (33,9%).

Quando explorada a utilização de hCG visando suas ações no CL, Gamboni et al. (1984) avaliaram o efeito da hCG na indução da formação do CL em ovelhas durante o período de anestro reprodutivo. Observações indicaram que a hCG atuou nos receptores de LH (LHR), promovendo a conversão de células pequenas em células grandes no tecido lúteo. Este processo resultou em um aumento do peso ou área luteal, demonstrando a capacidade da hCG de promover o desenvolvimento funcional do CL mesmo fora do período cíclico regular. Farin et al. (1988) corroboraram os achados de Gamboni et al., mostrando que a administração de hCG leva a um aumento significativo na área e no peso do CL, indicativo de um aumento na atividade funcional e produtiva do tecido lúteo. Gnanaprakasam et al. (1976) forneceram evidências de que a hCG se liga especificamente a folículos maduros e ao CL, mas não a folículos imaturos, sugerindo que a presença de receptores específicos (LHR) é necessária para a ação da hCG.

A administração de agentes luteotróficos como a hCG em protocolos reprodutivos de ovinos e caprinos tem mostrado ser uma estratégia eficaz para estimular a formação e função do corpo lúteo, aumentando os níveis de P4 e

melhorando o desempenho reprodutivo geral. Estudos como os Khan et al. (2009), Fonseca et al. (2018), Vergani et al. (2020) e Gonçalves et al. (2024) demonstram os benefícios da administração de hCG em ovelhas. Especificamente, Vergani et al. (2020) sugerem que a administração de 300 UI de hCG em ovelhas da raça Morada Nova, 7,5 dias após o início do estro, resultou na formação evidente de CLa a partir de folículos médios e grandes, por expressarem LHR, aumentando significativamente os níveis de P4. Este achado é crucial, pois indica que a hCG não terá efeito em folículos que não expressam esses receptores, limitando sua ação a estruturas reprodutivas mais desenvolvidas e funcionais.

O tratamento com hCG induz alterações específicas na expressão gênica e possivelmente na função proteica dentro do CL, destacando a expressão de mRNA para CXCR4, um receptor de quimiocina que pode estar envolvido em processos de sinalização celular importantes para a função e a manutenção do CL que aumentou significativamente ($P \leq 0,001$) em CL coletados no dia 25 (d0= dia do estro) de ovelhas tratadas com hCG em comparação com o controle e tendência de aumento da KDR, que é um receptor para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), importante para angiogênese e vascularização do CL, o que sugere um possível papel na manutenção e suporte do tecido luteal (Coleson et al., 2015).

Esses achados contribuem para um entendimento mais detalhado dos mecanismos pelos quais a hCG pode melhorar o desempenho reprodutivo em ovelhas, oferecendo conhecimentos valiosos para práticas de manejo reprodutivo e protocolos de fertilidade.

3. REFERÊNCIAS

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

Acosta TJ, Miyamoto A (2004). Vascular control of ovarian function: Ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science** 82 – 83: 127 – 140.

Acritopoulou S, Haresign W (1980). Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF-2 given at different stages of the oestrous cycle. **Reproduction** 58: 219–223.

Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL (2002). The Lutropin/Choriogonadotropin Receptor, A 2002 Perspective. **Endocrine Reviews** 23: 141–174.

Azari K, Habibizad J, Samadian F, Ghaderia-Zefrehel M (2020). Effect of hCG administration in different days after mating on reproductive performance and serum progesterone concentration of Toriki-Ghashghaei ewes. **Iranian Veterinary Journal** 16: 40–46.

Bazer FW, Burghardt R, Johnson G, Spencer T, Wu G (2018). Mechanisms for the establishment and maintenance of pregnancy: synergies from scientific collaborations. **Biology of reproduction** 99: 225–241.

Bolet G (1986). Timing and Extent of Embryonic Mortality in Pigs Sheep and Goats: Genetic Variability. **Embryonic Mortality in Farm Animals** 12–43.

Bruno-Galarraga M, Cano-Moreno V, Lago-Cruz B, Encinas T, Gonzalez-Bulnes A, Martinez-Ros P (2021). The Use of hCG for Inducing Ovulation in Sheep Estrus Synchronization Impairs Ovulatory Follicle Growth and Fertility. **Animals: an Open Access Journal from MDPI** 11: 1 – 8.

Catalano R, Teruel M, González C, Williams S, Dorna I, Callejas S (2015). Reproductive performance of ewe lambs in non-breeding season exposed to hCG at day 12 post mating. **Small Ruminant Research** 124: 63–67.

Cole LA (2009). New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. **Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E** 7: 8.

Cole LA (2010). Biological functions of hCG and hCG-related molecules. **Reproductive Biology and Endocrinology** 2010 8:1 8:1–14.

Cole LA (2012). hCG, the wonder of today's science. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**10: 24.

Cole LA, Kardana A, Yng FC, Birken S (1991). **The biological and clinical significance of nicks in human chorionic gonadotropin and its free beta-subunit.** Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/21429468_The_biological_and_clinical_significance_of_nicks_in_human_chorionic_gonadotropin_and_its_free_beta-subunit>. Acesso em: 15 jun. 2024.

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.

Contreras-Solis I, Vasquez B, Diaz T, Letelier C, Lopez-Sebastian A, Gonzalez-Bulnes A (2009). Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect”. **Theriogenology** 71: 1018–1025.

Dias LMK, Sales JNS, Viau P, Barros MBP, Nicolau SS, Simões LMS, Alves NG, Alonso MA, Valentim R, Oliveira CA (2018). Although it induces synchronized ovulation, hCG reduces the fertility of Santa Ines ewes submitted to TAI. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia** 70: 122–130.

Dixon AB, Knights M, Winkler JL, Marsh DJ, Pate JL, Wilson ME, Dailey RA, Seidel G, Inskeep EK (2007). Patterns of late embryonic and fetal mortality and association with several factors in sheep. **Journal of Animal Science** 85: 1274–1284.

Duggavathi R, Bartlewski PM, Pierson RA, Rawlings NC (2003). Luteogenesis in Cyclic Ewes: Echotextural, Histological, and Functional Correlates¹. **Biology of Reproduction** 69: 634–639.

Facó O, Paiva SR, Alves LRN, Lôbo RNB, Villela LCV (2008). **Raça Morada Nova: Origem, Características e Perspectivas**. Sobral: Embrapa Caprinos, 41p. (Embrapa Caprinos. Documentos 75).

Falchi L, Ledda S, Zedda MT (2022). Embryo biotechnologies in sheep: Achievements and new improvements. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene** 57: 22–33.

Farin CE, Moeller CL, Mayan H, Gamboni F, Sawyer HR, Niswender, GD (1988). Effect of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on cell populations in the ovine corpus luteum. **Biology of reproduction** 38: 413–21.

Fields MJ, Shemesh M (2004). Extragonadal Luteinizing Hormone Receptors in the Reproductive Tract of Domestic Animals. **Biology of Reproduction** 71: 1412–1418.

Fierro S, Oliveira-Muzante J, Gil J, Viñoles C (2011). Effects of prostaglandin administration on ovarian follicular dynamics, conception, prolificacy, and fecundity in sheep. **Theriogenology** 76: 630–639.

Fierro S, Gil J, Viñoles C, Oliveira-Muzante J (2013). The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. **Theriogenology** 79: 399–408.

Fierro S, Olivera-Muzante J (2017). Long interval prostaglandin as an alternative to progesterone-eCG based protocols for timed AI in sheep. **Animal Reproduction Science** 180: 78–84.

Figueira L, Fonseca JF, Arashiro EKN, Souza-Fabjan JMG, Ribeiro ACS, Oba E, Viana JHM, Brandão FZ (2015). Colour Doppler Ultrasonography as a Tool to Assess Luteal Function in Santa Inês Ewes. **Reproduction in Domestic Animals** 50: 643–650.

Fonseca JF, Castro ACR, Arashiro EKN, Oliveira MEF, Zambrini FN, Esteves LV, Brandão FZ, Souza-Fabjan JMG (2018). Effects of hCG administration on accessory corpus luteum formation and progesterone production in estrous-induced nulliparous Santa Inês ewes. **Animal Reproduction** 15:135–139.

Fonseca JF (2005). 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. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal** 16: 1–9.

Gamboni F, Fitz TA, Hoyer PB, Wise ME, Mayan MH, Niswender GD (1984). Effect of human chorionic gonadotropin on induced ovine corpora lutea during the anestrous season. **Domestic Animal Endocrinology** 1:79–88.

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.

Godfrey RW, Collins JR, Hensley EL, Wheaton JE (1999). Estrus synchronization and artificial insemination of hair sheep ewes in the tropics. **Theriogenology** 51: 985–997.

Gonçalves JD, Vergani GB, Rodrigues JND, Dias JH, Pereira VSA, Garcia AR, Esteves SN, Fonseca JF, Oliveira MEF (2024). Luteal tissue characteristics of Morada Nova ewes with hCG application 7.5 days after the end of estrus synchronization protocol in the breeding season. **Animal Reproduction Science** 261: 107396.

Hauss De Souza W, Cezar MF, Cunha MGG, Lôbo RNB (2006). **Estratégias de Cruzamentos para Produção de Caprinos e Ovinos de Corte: Uma Experiência da Emepa**. Paraíba: Emepa, 32p.

Houghton JAS, Liberat N, Schrick FN, Towsand EC, Dailey RA, Inskeep EK (1995). Day of estrous cycle affects follicular dynamics after induced luteolysis in ewes. **Journal of Animal Science** 73: 2094–2101.

McCracken JA, Glewand ME, Scaramuzzi RJ (1970). Corpus Luteum Regression Induced By Prostaglandin F₂α. **Journal Clinical Endocrinology & Metabolism** 30: 544, 1970.

Jia X, Ma W, Wu Z, Xu S, Wang X, Wang X, Yang Q, Li S, Zhang X, He Z, Wu S, Tao H, Fang Y, Song Y (2023). Transcriptomic characterization of sheep conceptus elongation and implantation II Single-cell transcriptomic characterization of sheep conceptus elongation and implantation. **CellReports** 42: 112860.

Khan TH, Beck NFG, Khalid M (2009). The effect of hCG treatment on Day 12 post-mating on ovarian function and reproductive performance of ewes and ewe lambs. **Animal Reproduction Science** 116: 162–168.

Kittok RJ, Stellflug JN, Lowry SR (1983). Enhanced Progesterone and Pregnancy Rate after Gonadotropin Administration in Lactating Ewes. **Journal of Animal Science** 56: 652–655.

Kornyel JL, Lei ZM, Rao CV (1993). Human myometrial smooth muscle cells are novel targets of direct regulation by human chorionic gonadotropin. **Biology of reproduction** 49: 1149–1157.

Lei ZM, Reshef E, Rao CV (1992). The expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors in human endometrial and myometrial blood vessels. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** 75: 651–659.

Letelier CA, Contreras-Solis I, García-Fernández RA, Sánchez MA, García-Palencia P, Sánchez B, Ariznavarreta C, Tresguerres JAF, Flores JM, Gonzalez-Bulnes A (2011). Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. **Animal Reproduction Science** 126: 61–69.

Maia ALRS, Brandão FZ, Souza-Fabjan JMG, Balara MFA, Oliveira MEF, Facó O, Fonseca JF (2017). Reproductive parameters of dairy goats after receiving two doses of d-cloprostenol at different intervals. **Animal Reproduction Science** 181:16–23.

Marques VB, Bertan CM, Barreto De Almeida A, Meirelles V, De Carvalho Papa P, Binelli M (2007). Interferon-tau e o reconhecimento da gestação em bovinos (Interferon-tau and pregnancy recognition in cattle). **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 31: 479-488.

Cxm 2-2023. Maximum residue limits (mrls) and risk management recommendations (rmrs) for residues of veterinary drugs in foods cxm 2-2023. **Codex Alimentarius International Food Standards**. Disponível em: < <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/it/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXM%2B2%252FMRL2e.pdf/>>. Acesso em: 20 out. 2024.

McCracken JA, Carlson JC, Glew ME, Goding JR, Baird DT (1972). Prostaglandin F_{2α} identified as a Luteolytic Hormone in Sheep. **Nature New Biology** 238: 129–134.

Menchaca A, Rubianes E (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, fertility, and development** 16: 403–13.

Miyamoto A, Shirasuna K, Sasahara K (2009). Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. **Domestic Animal Endocrinology** 37: 159–169.

Mock EJ, Niswenderf GD (1983). Differences in the Rates of Internalization of 125 I-Labeled Human Chorionic Gonadotropin, Luteinizing Hormone, and Epidermal Growth Factor by Ovine Luteal Cells. **Endocrinology** 113: 259-264.

Nascimento AB, Bender RW, Souza AH, Ayres H, Araujo RR, Guenther JN, Sartori R, Wiltbank MC (2013). Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** 96: 2873–2882.

Nephew KP, Cárdenas H, McClure KE, Ott TL, Bazer FW, Pope WF (1994). Effects of administration of human chorionic gonadotropin or progesterone before maternal recognition of pregnancy on blastocyst development and pregnancy in sheep. **Journal of Animal Science** 72: 453–458.

Nisula BC, Blithe DL, Akar A, Lefort G, Wehmann RE (1989). Metabolic fate of human choriogonadotropin. **Journal of Steroid Biochemistry** 33: 733–737.

Olivera-Muzante J, Gil J, Fierro S, Menchaca A, Rubianes E (2011). Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. **Theriogenology** 75: 1232–1238.

Pate JL, Hughes CHK (2023). Review: Luteal prostaglandins: mechanisms regulating luteal survival and demise in ruminants. **Animal** 17: 100739.

Pierce JG, Parsons TF (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. **Annual Review of Biochemistry** 50: 465-494.

Rodrigues JND, Guimarães JD, Oliveira MEF, Dias JH, Arrais AM, De Sousa MAP, Bastos R, Ahmadi B, Bartlewski PM, Fonseca JF (2022). Human chorionic gonadotropin affects original (ovulatory) and induced (accessory) corpora lutea, progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous dairy goats. **Reproductive Biology** 22: 100591.

Rubianes E, Menchaca A, Carbajal B (2003). Response of the 1–5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F₂α. **Animal Reproduction Science** 78: 47–55.

Silva PJ, Juengel JL, Rollyson MK, Niswender GD (2000). Prostaglandin Metabolism in the Ovine Corpus Luteum: Catabolism of Prostaglandin F₂α (PGF₂α) Coincides with Resistance of the Corpus Luteum to PGF₂α. **Biology of Reproduction** 63: 1229–1236.

Silver M (1994). Placental progestagens in the sheep and horse and the changes leading to parturition. **Exp Clin Endocrinol**. **Experimental and Clinical Endocrinology** 102: 203-211.

Simões J, Almeida JC, Baril G, Azevedo J, Fontes P, Mascarenhas R (2007). Assessment of luteal function by ultrasonographic appearance and measurement of corpora lutea in goats. **Animal Reproduction Science** 97: 36–46.

Smith MF, McIntush EW, Ricke WA, Kojima FN, Smith GW (1999). Regulation of ovarian extracellular matrix remodelling by metalloproteinases and their tissue inhibitors: effects on follicular development, ovulation and luteal function. **Journal of Reproduction and fertility. Supplement** 54: 367–381.

Sousa R, Gonçalves J, Fonteles N, Santos C, Ricci G, Albuquerque F, Fernandes F, Bomfim M (2015). Características reprodutivas de ovelhas Morada Nova e Somalis Brasileira. **PubVet** 9: 495–501.

Spencer TE, Ott TL, Bazer FW (1996). Interferon: Pregnancy Recognition Signal in Ruminants. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** 215-229.

Sullivan RR, Faris BR, Eborn D, Griegel DM, Cino-Ozuna AG, Rozell TG (2013). Follicular expression of follicle stimulating hormone receptor variants in the ewe. **Reproductive Biology and Endocrinology** 11: p. 1–8.

Vergani GB, Fonseca JF, Trevizan JT, Pereira VSA, Garcia AR, Esteves SN, Brandão FZ, Souza-Fabjan JMG, Oliveira MEF (2020). Luteotropic effects of human chorionic gonadotropin administered 7.5 days after synchronous estrous induction in Morada Nova ewes. **Animal Reproduction Science** 223: 106644.

Veronesi MC, Gabai G, Battocchio M, Mollo A, Soldano F, Bono G, Cairoli F (2002). Ultrasonographic appearance of tissue is a better indicator of CL function than CL diameter measurement in dairy cows. **Theriogenology** 58: 61–68.

Hajibemani A, Heydari Y, Asadpour R, Fath E (2023). The effect of 2PGF₂ α and P4eCG protocol of estrus synchronization on reproductive performance of nulliparous Ghezel ewes. *Large Animal Review*, 2023. Disponível em: <<https://www.largeanimalreview.com/index.php/lar/article/view/643/231>>. Acesso em: 6 jun. 2024.

Viñoles C, Rubianes E (1998). Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. **Canadian Journal of Animal Science** p. 429–431.

Wiltbank MC, Monteiro PLJ, Domingues RR, Andrade JPN, Mezera MA (2023). Review: Maintenance of the ruminant corpus luteum during pregnancy: interferon-tau and beyond. **Animal** 17: 100827.

CAPÍTULO 2 - Efeitos da gonadotrofina coriônica humana na prenhez e nos indicadores da função luteínica de ovelhas Morada Nova após sincronização do estro com prostaglandina

RESUMO – O objetivo desta pesquisa foi avaliar protocolos de sincronização do estro com duas aplicações de 150µg de cloprostenol sódico (análogo da PGF2α) com intervalos de 7,5 ou 11,5 dias, associados ou não a estimulação gonadotrófica com 300 UI de hCG administrada 7,5 dias após a 2ª aplicação de PGF2α em fêmeas Morada Nova na primavera. Oitenta e oito ovelhas cíclicas receberam 150 µg de cloprostenol sódico em um dia aleatório do ciclo estral. Uma segunda dose aplicação foi realizada 7,5 (G_{PG - 7,5} n= 44) ou 11,5 (G_{PG - 11,5} n= 43) dias após a primeira aplicação. Sete e meio dias depois da 2ª aplicação de PGF2α, as ovelhas foram redistribuídas em dois tratamentos, metade delas (n= 43) recebeu 1mL de solução salina e a outra metade (n= 44) recebeu 300 UI de hCG. Deste modo, formaram-se os seguintes grupos: G_{PG - 7,5sal}; G_{PG - 11,5 sal}; G_{PG - 7,5 hCG} e G_{PG - 11,5 hCG}, vinte e quatro horas após, as fêmeas foram submetidas à monta natural noturna em arena por três noites (das 18h30min às 06h30min) consecutivas. Foram feitas ultrassonografias seriadas desde a aplicação da hCG até o diagnóstico de prenhez, realizado 30 dias depois das montas noturnas. A taxa de prenhez não diferiu (p> 0,05) entre os grupos. O tempo entre a 2ª aplicação e a manifestação do estro foi menor (p< 0,05) para o G_{PG - 7,5}, embora não tenha ocorrido diferença entre os grupos no número de ovulações após a sincronização do estro. O número de CL ao longo da fase lueínica foi maior (p< 0,05) para as ovelhas do G_{PG - 7,5 hCG}. Por sua vez, o G_{PG - 7,5sal} teve os menores valores numéricos (p< 0,05) para volume, área e diâmetro ldo corpo lúteo, bem como os indicadores da sua vascularização, com efeitos independentes entre si. Conclui-se que os protocolos de sincronização com duas aplicações de PGF2α em intervalos de 7,5 ou 11,5 são eficazes para uso em ovelhas Morada Nova acasaladas na primavera da região Sudeste do Brasil. Além disso, esses protocolos podem ser administrados de forma simultânea, de modo a favorecer a adoção da monta noturna e otimizar o uso de reprodutores e a suplementação com hCG favorece o aumento no número de corpos lúteos.

Palavras-chave: Biometria luteal; Corpo lúteo; hCG; Perfusão sanguínea luteal; Ovinos.

1 Introdução

A utilização da prostaglandina (PGF2α) e de seus análogos vem sendo estudada como alternativa menos onerosa e de fácil administração, principalmente nos países da União Europeia e EUA, que restringem o uso de progestágenos na reprodução de animais de produção (Menchaca & Rubianes, 2004). Além disso, as PGF2α mostram-

se eficientes na sincronização do estro e alcançam taxas satisfatórias de prenhez e prolificidade em ovelhas (Almeida et al., 2018).

A sincronização do estro com a utilização de análogos sintéticos da PGF2 α em pequenos ruminantes, pode ser realizada em dose única (Acritopoulou et al., 1980; Houghton et al., 1995; Rubianes et al., 2003), em duas doses com intervalos de sete (Menchaca et al., 2004; Fierro et al., 2011; Texeira et al., 2016; Vilariño et al., 2017; Almeida et al., 2018), nove (Solis et al., 2009; Almeida et al., 2018), 10 Gonzalez-Bulnes, et al., 2005; Vázquez et al., 2010; Fonseca et al., 2012; Esteves et al., 2013; Maia et al., 2017), 11 ou 11,5 dias (Boland et al., 1978; Maia et al., 2017; Bonato et al., 2019) em fêmeas cíclicas.

A taxa de crescimento e tamanho folicular semelhantes podem estar relacionados a diferentes concentrações de 17 β -estradiol (E2) e progesterona (P4), que regulam negativamente a frequência e pulso do hormônio luteinizante (LH), estando suas concentrações maiores em fêmeas protocoladas com duas doses de PGF2 α com intervalos maiores (14 ou 16 dias) e menores em intervalos mais curtos (10 ou 12 dias), refletindo na taxa de concepção e fertilidade (Fierro et al., 2016).

Almeida et al. (2018) compararam diferentes intervalos de administração de análogo da PGF2 α (7, 9 ou 11,5 dias) e não encontraram diferenças na resposta ao tratamento em relação a responsividade e duração do estro, no intervalo entre a segunda aplicação e a ovulação, e nem na taxa de ovulação. Observaram, porém, que houve diferença no intervalo do estro até a ovulação. É fundamental que o protocolo utilizado permita a formação de um corpo lúteo (CL) funcional com boa produção de P4, pois esta desempenha um papel fundamental nos eventos reprodutivos correlacionados ao estabelecimento e manutenção da gestação. Além de serem observados seus efeitos na P4 no alongamento embrionário em bovinos e ovinos após a concepção, esta fornece um ambiente endometrial propício para o desenvolvimento do conceito, mantém o miométrio quiescente. Assim, é o protocolo hormonal de sincronização de estro utilizado o responsável pelo desenvolvimento do CL (Spencer et al., 1996; Clemente et al., 2009; Menchaca et al., 2016).

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) pode ser administrada na fase lútea inicial (Coleson et al., 2015; Fernandez et al., 2018; Fonseca et al., 2018; Fernandez et al., 2019) ou tardia (Cam et al., 2004; Khan et al., 2009; Moieni et al., 2013; Catalano et al., 2015), com doses distintas de 250 UI (Fonseca et al., 2018), 300 UI (Fernandez et

al., 2019; Gonçalves et al., 2024) e 600 UI (Coleson et al., 2015) fora e durante a estação reprodutiva. O seu uso tem sido frequente por apresentar meia-vida de maior duração quando comparada com o LH (37 horas e 25 a 20 minutos, respectivamente) e por favorecer a manutenção da função lútea por meio do aumento das concentrações circulatórias de P4. Essa propriedade decorre do aumento da área do CL original (CLO), bem como a formação de um CL acessório (CLa) (Cole, 2012; Vergani et al., 2020; Dias et al., 2022; Rodrigues et al., 2023).

Diante do exposto, o presente estudo teve objetivo de avaliar protocolos de sincronização de estro com duas aplicações de 150µg de cloprostenol sódico, um análogo de PGF2α com intervalos de 7,5 ou 11,5 dias, associados ou não a estimulação gonadotrófica com 300 UI de hCG administrada 7,5 após segunda aplicação do cloprostenol em ovelhas Morada Nova na primavera.

2 Material e métodos

Ética e Local do experimento

Todos os procedimentos desta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais da Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos, SP, Brasil; Protocolo 04/2023). O experimento foi conduzido na Embrapa Pecuária Sudeste, Fazenda Canchim (21°57'28,5" Sul e 47°50'36,6" Oeste), São Carlos, São Paulo, Brasil, no período de setembro a novembro.

Animais

Utilizou-se um rebanho com 94 fêmeas saudáveis e não lactantes e seis reprodutores, todos da raça Morada Nova. Esses animais foram separados por gênero, em sistema semi-intensivo, mantidos em área de pastagem cultivada (*Panicum max* cv. aruana) com rotação entre os piquetes e receberam suplemento vitamínico e 200g/animal/dia de silagem de milho. Havia livre acesso para água e o sal mineral.

Ciclicidade das fêmeas e aptidão reprodutiva dos machos

As 94 fêmeas foram submetidas a exames de: saúde geral, vaginoscópico e ultrassonográfico, todos realizados um mês antes do início do experimento propriamente dito. Elas foram triadas com relação à ciclicidade por meio de três avaliações ultrassonográficas consecutivas, em intervalos de sete dias. Uma ovelha era considerada cíclica quando apresentava, em uma das três ultrassonografias um corpo lúteo vascularizado (Vergani et al., 2020). Os detalhes da realização das ultrassonografias estão descritos em tópico mais adiante.

As ovelhas cíclicas tinham idade média de $2,7 \pm 0,1$ anos, apresentando $2,9 \pm 0,04$ como escore de condição corporal (ECC) numa escala de um a cinco (Moraes et al., 2005), com peso corporal de $36,6 \pm 0,7$ kg.

Sincronização do estro

Em um dia aleatório do ciclo estral, as fêmeas receberam 150 µg (cloprostenol sódico, Sincrocio®, Ouro fino LTDA, São Paulo, Brasil), por via intramuscular (i.m) entre 6h e 6h30mn da manhã. A partir disso, as ovelhas foram distribuídas em dois grupos de igual número, o $G_{PG - 7,5}$ e o $G_{PG - 11,5}$. A distribuição permitiu obter grupos homogêneos em termos de idade, peso vivo, ECC e número de nulíparas e pluríparas. No $G_{PG - 7,5}$ uma segunda aplicação de cloprostenol sódico (mesma dose e via) foi administrada sete dias depois, entre 18 e 18h30 min da tarde, ou seja, 7,5 dias depois da primeira. No $G_{PG - 11,5}$ a segunda aplicação de cloprostenol foi feita onze dias depois, entre 18h e 18h30min da tarde, ou seja, 11,5 dias depois da primeira (Figura 1).

Monta natural

Para realização da monta natural (MN), foram utilizados seis reprodutores com idade, peso corporal e ECC médios de $2,0 \pm 0,0$ anos, $51,6 \pm 2,7$ kg e $3,0 \pm 0,0$, respectivamente. Trinta dias antes do início das atividades, esses animais foram submetidos ao exame clínico-andrológico. Todos foram aprovados para uso em monta segundo os padrões definidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Os valores (média \pm erro padrão da média) observados foram: perímetro escrotal ($29,8 \pm 0,6$ cm); volume ejaculado= $0,9 \pm 0,04$ mL; movimento de massa= $3,1 \pm 0,16$ (escala 0 – 5); motilidade espermática= $74,2 \pm 3,27$; vigor= $3,7 \pm 0,4$ (escala 0 – 5); espermatozoides morfologicamente normais= $90 \pm 1,71$ (%).

O regime de reprodução usado foi a monta noturna em arena (Figura 1), estabelecendo uma relação macho:fêmeas de 1:16. Assim, 24 horas após a 2ª dose de PGF2 α no G_{PG-7,5} foram juntadas oito fêmeas para cada reprodutor. Isso ocorreu às 18h30min do dia oito e meio desde a primeira aplicação de cloprostenol. As fêmeas foram retiradas 12 horas depois, ou seja, às 06h30min da manhã seguinte. Essa operação se repetiu por outras duas noites e depois com outras 08 fêmeas, agora do G_{PG-11,5}, 12,5 dias depois da 1ª aplicação do cloprostenol deste grupo, e se repetiu por mais duas noites. As ovelhas que eram marcadas não voltavam na noite subsequente. Para identificação da monta, os reprodutores foram equipados com cinturão peitoral acoplado a um estojo para “sabonete” marcador com tintas de cores diferentes. A observação da monta ocorria no momento em que o lote de fêmeas era juntado ao macho e na manhã seguinte, durante a retirada das fêmeas dos lotes, registrando quais foram marcadas ou não. Após as montas noturnas, houve repasse pelos mesmos reprodutores, feito em piquetes de aproximadamente 2.000 m² até que se completassem, no máximo 45 dias após a segunda aplicação de cloprostenol.

Tratamento com hCG

Após a etapa de monta, as fêmeas foram subdivididas para receber 1 mL de solução salina (G_{PG-7,5sal}, n= 22 e G_{PG-11,5sal}, n=21) ou 300 UI de hCG (Fertcor; ©Ceva Saúde Animal Ltda, São Paulo, SP; Brasil), por via i.m (G_{PG-7,5hCG}, n=22 e G_{PG-11,5hCG}, n= 23). Essa subdivisão foi feita para obter grupos homogêneos em termos de idade, peso vivo, ECC e número de nulíparas e pluríparas. Essa aplicação foi realizada 7,5 dias depois da segunda dose de cloprostenol (Figura 1).

Avaliações ultrassonográficas dos ovários e diagnóstico de gestação

As ovelhas deveriam estar obrigatoriamente ciclando ao início do experimento. Assim foi feita uma triagem ovariana. Para realizar essa triagem e outros exames utilizou-se a ultrassonografia em modo B e em modo color Doppler. Foi utilizado aparelho portátil equipado com transdutor linear de frequência variável (6 – 8 MHz, Z60-Vet®; Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China). Nos outros exames foram conduzidas: a) determinação da população folicular aos sete-e-meio dias após a 2ª aplicação do cloprostenol (coincidente com a data de administração da

hCG ou solução salina); b) avaliação do desenvolvimento do(s) corpo(s) lúteo(s) os 7,5, 10,5, 13,5, 16,5 e 19,5 após a 2ª aplicação do cloprostenol. Nestas ocasiões foram feitas a biometria do CL e sinais do color Doppler luteal; c) diagnóstico de gestação aproximadamente 30 dias após a ocorrência das montas naturais nas ovelhas (Figura 1).

As fêmeas foram examinadas em posição quadrupedal, estando contidas em brete adaptado. Foram removidos paletes de fezes do canal retal, adicionando-se gel de contato hidrossolúvel (Plurigel®, Carbogel Indústria e Comércio LTDA, São Paulo, Brasil) para lubrificação do canal na quantidade de 10 mL.

Os números de folículos e de CLs presentes em todas as avaliações foram quantificados. Essas estruturas foram mensuradas a partir da análise das imagens que haviam sido salvas durante os exames ultrassonográficos. Para tanto, utilizou-se o software Image J® (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). Os folículos antrais ovarianos foram quantificados 7,5 dias após a 2ª aplicação do cloprostenol e categorizados por diâmetro: folículos pequenos ($\leq 3,49$ mm), médios (3,50 – 4,49 mm), grandes (4,50 – 5,49 mm) e pré-ovulatórios ($\geq 5,50$ mm) (Vergani et al., 2020). Nos dias 7,5, 10,5, 13,5, 16,5 e 19,5 após a 2ª aplicação do cloprostenol foram avaliados: o número total de CL, o diâmetro (comprimento médio dos eixos vertical e horizontal) e a área do CL, na maior área do CL determinado a partir do perímetro externo da estrutura. O volume foi estimado a partir da fórmula do volume da esfera ($4/3 \times \pi \times r^3$), sendo r = raio e π = 3,1416, a partir das imagens cujo corte continha as estruturas de maior dimensão. Para determinar a área de tecido lúteo do CL cavitário subtraiu-se a área da cavidade da área total do CL. A porcentagem da área de sinais color Doppler/área luteal total foi determinada a partir da fórmula: número de pixels coloridos/número de pixels ovarianos totais $\times 100$. Sequencialmente, foi calculada a área e o volume de sinais color Doppler luteal a partir da porcentagem de perfusão sanguínea das imagens obtidas pelo software Image J® (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). Essas variáveis foram estimadas pelas fórmulas: área: média do percentual de vascularização \times a área somada do tecido luteal/100 e volume: média do percentual de vascularização \times o volume somado do tecido luteal/100. Para a ecogenicidade luteal foram utilizadas imagens em modo B utilizando o software Image Pro Plus® (Média, Cybernetics Inc., San Diego, CA, EUA). Os valores numéricos de pixel são determinados em escala de cinza de 0 (preto

absoluto) a 255 (branco absoluto), adquirindo os valores médios de pixel lúteo e a heterogeneidade do pixel lúteo a partir de um círculo ocupado pela maior área luteal. Novamente, nos casos de CL cavitário, excluiu-se a área de sua cavidade (Vergani et al., 2020; Rodrigues et al., 2023; Gonçalves et al., 2024). O diagnóstico de gestação foi realizado aproximadamente aos 30 dias após a monta natural, observando a vesícula gestacional e estrutura ecogênica com batimentos cardíacos, evidenciando a presença e viabilidade embrionária (Correia Santos et al., 2018).

Análises estatísticas

As análises foram realizadas utilizando o software Statistical Analysis System (SAS). Para a variável como momento de cobertura (horas) após a administração da segunda dose de cloprostenol sódico foi procedida a Análise de Variância (ANOVA) unidirecional e a comparação post-hoc foi realizada pelo teste de Tukey ou exato de Fisher entre os grupos ($G_{PG-7,5}$ e $G_{PG-11,5}$), tratamentos ($G_{PG-7,5sal}$, $G_{PG-11,5sal}$, $G_{PG-7,5hCG}$ e $G_{PG-11,5hCG}$) e entre todas as fêmeas marcadas após a saída do lote com os reprodutores.

Aos sete-e-meio dias após a 2ª aplicação de cloprostenol foram mensurados: o número de folículos antrais ovarianos (nas diferentes categorias de diâmetro, como: $\geq 3,49$ mm, $3,50 - 4,49$ mm, $4,50 - 5,49$ mm ou $\leq 5,50$ mm e a porcentagem de ovelhas com pelo menos um folículo antral com $\leq 3,49$ mm, $3,50 - 4,49$ mm, $4,50 - 5,49$ mm ou $\geq 5,50$ mm de diâmetro. Nas avaliações ultrassonográficas seriadas, feitas aos 7,5, 10,5, 13,5, 16,5 e 19,5 dias após a 2ª aplicação de cloprostenol foram determinados: o número total de ovulação/CL; o diâmetro lúteo (mm); a área lútea (mm^2); o volume lúteo (mm^3); a área de sinais color Doppler/área lútea total (%); área de sinais color Doppler luteal (mm^2); o volume de sinais color Doppler luteal (mm^3); os valores médios de pixel lúteo; a heterogeneidade do pixel lúteo e o número de ovelhas prenhes /número de fêmeas sincronizadas $\times 100$ (taxa de prenhez %).

Para todas as variáveis foram feitas comparações entre os grupos ($G_{7,5} \times G_{11,5}$), entre os tratamentos (hCG \times Salina), entre os dias (7,5, 10,5, 13,5, 16,5 e 19,5) e diagnóstico de gestação (prenhe e não prenhe) e suas possíveis interações no dia 30. Os dados foram submetidos à análise da normalidade dos resíduos (Shapiro Wilk) e aqueles com distribuição normal foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para tanto, usou-se o procedimento PROC-MIXED com uma declaração repetida para

avaliar a interação entre medidas sequenciais. O desempenho reprodutivo, o número de CLs e a população folicular foram comparados entre os grupos por ANOVA unidirecional e a comparação post-hoc ou teste Qui-quadrado. Houve diferença entre as médias quando $p < 0,05$ e foi considerada tendência quando $p > 0,05$ e $p < 0,10$. Os resultados no texto, tabelas ou figuras são representados como média \pm erro padrão da média.

3 Resultados

Houve 88 ovelhas cíclicas, sendo 56 pluríparas e 32 nulíparas. Portanto, a taxa de ciclicidade foi de 93,62% no período da primavera na região Sudeste do Brasil.

O intervalo de tempo entre a segunda administração de cloprostenol sódico até a manifestação do estro diferiu ($p < 0,05$) entre os grupos. As fêmeas sincronizadas com intervalo de 7,5 dias apresentaram estro mais cedo do que aquelas protocoladas com 11,5 dias (média de $47,5 \pm 2,65$ e $57,6 \pm 3,33$ horas, respectivamente) (Tabela 1). Na Tabela 2, verifica-se que não houve diferença entre os grupos na população folicular ou no número de ovulações no dia 7,5.

Para ambos os grupos ($G_{PG-7,5}$ e $G_{PG-11,5\text{sal}}$) houve interação entre a administração de 300 UI da hCG e os dias de avaliação para o número de CL (Figura – 2 – A) de modo que o $G_{PG-7,5\text{sal}}$ teve número menor de CLs ($1,4 \pm 0,07^c$) comparado aos demais ($G_{PG-7,5\text{hCG}}$: $2,08 \pm 0,09^a$; $G_{PG-11,5\text{sal}}$: $1,8 \pm 0,08^{ab}$; $G_{PG-11,5\text{hCG}}$: $1,7 \pm 0,08^{ab}$), com diferença do dia 13,5, 16,5 e 19,5. A aplicação de hCG aumentou ($p < 0,05$) o número de CLs, pois o $G_{PG-7,5\text{hCG}}$ foi superior aos grupos salina e não diferiu do $G_{PG-11,5\text{hCG}}$ (Figura – 2).

Para a variável área luteal, o efeito significativo se deu entre os grupos tratados e o dia da avaliação ultrassonográfica (Figura – 2 – B). Já o diâmetro luteal tendeu ($p=0,052$) a ser maior para $G_{PG-11,5\text{hCG}}$ do que para o $G_{PG-7,5\text{sal}}$. Observou-se efeito significativo do dia da avaliação ultrassonográfica para o diâmetro e o volume luteais, evidenciando valores menores no dia 7,5 (Figura – 2 – C e 2 – D) denotando progressivo crescimento dos corpos lúteos.

A área de sinais color Doppler/área luteal total tendeu ($p=0,056$) a ter interação entre os grupos e os dias de avaliação ultrassonográfica (Figura – 3 – A). Os

tratamentos com hCG aumentou a porcentagem de vascularização (área de sinais color Doppler/área luteal total; Figura – 3 – A), atingindo o maior valor na avaliação do dia 10,5 em comparação aos demais dias. A área de sinais color Doppler luteal foi maior ($p < 0,05$) no $G_{PG-7,5hCG}$ comparado aos demais grupos. No dia 7,5, observou-se a menor área vascularizada (Figura – 3 – B). O tratamento com hCG tendeu a afetar o volume ($p = 0,09$) que foi menor para o $G_{PG - 7,5sal}$. O volume diferiu ($p < 0,05$) quanto aos dias de realização do exame, fruto do crescimento lúteo (Figura – 3 – C).

Observou-se apenas efeito entre os grupos para a ecogenicidade luteal, efeito para grupo e dia para a heterogeneidade do pixel luteal. Notou-se tendência de interação nos dias 13,5 e 16,5 superior para $G_{PG - 11,5sal}$ para valores médio do pixel lúteo e no dia 19,5 para a heterogeneidade (Figura – 4 – A e 2 – B).

A taxa de prenhez não diferiu entre os grupos ($G_{PG - 7,5sal}$, $G_{PG - 7,5hCG}$, $G_{PG - 11,5sal}$ e $G_{PG - 11,5hCG}$) (Tabela 1).

4 Discussão

A partir do levantamento feito, conclui-se que este é o primeiro estudo que reporta a utilização do protocolo de sincronização de estro com duas aplicações de um análogo de $PGF2\alpha$ com intervalos de 7,5 e 11,5, associados ou não ao efeito luteotrófico da hCG em ovelhas Morada Nova.

Ambos os intervalos de administração do cloprostenol foram eficazes para sincronizar o estro de ovelhas Morada Nova. O uso da hCG associado ao protocolo não aumentou a taxa de prenhez, a qual não diferiu entre os grupos. Houve, porém, uma tendência de obter maior número de CLs no $G_{PG - 7,5hCG}$ em relação aos demais grupos.

A espécie ovina é considerada poliéstrica estacional, pois a atividade reprodutiva é influenciada pelo fotoperíodo. Nas regiões tropicais e subtropicais essa estacionalidade é menos profunda à medida que se aproxima do Equador (Fonseca, 2005), de modo que, no Brasil, as ovelhas, especialmente as nativas das raças deslanadas, podem se comportar como poliéstricas contínuas (Simplício et al, 2001; Coelho et al., 2006).

Balero et al. (2014) observaram certo grau de estacionalidade em fêmeas deslanadas da raça Santa Inês ao verificarem menores concentrações plasmáticas de progesterona nessas ovelhas durante a primavera. No presente estudo, as ovelhas deslanadas Morada Nova estavam cíclicas nessa mesma estação. O anestro observado em apenas algumas fêmeas provavelmente foi devido a outras causas que não a estacionalidade reprodutiva. Este achado é muito importante, pois ele credencia o uso de protocolos de sincronização do estro baseados na PGF2 α (e seus análogos) em qualquer época do ano para esses animais. Dispensa, portanto, a obrigatoriedade de auxiliar os tratamentos com fármacos indutores da atividade reprodutiva (progesterona ou progestágenos, sais de estradiol e agentes gonadotróficos com eCG).

Similarmente aos achados do presente estudo, Almeida et al. (2018), trabalhando com ovelhas mestiças deslanadas com protocolo de PGF2 α , verificaram que o estro foi mais curto para fêmeas tratadas com protocolo de sete dias (36,5h) em relação ao de 11,5 dias (43,7h). Essa diferença se propagou para o tempo entre o estro e a ovulação, que foi de 20,3 horas para as protocoladas com intervalo de sete dias e 35 horas para as tratadas com 11,5 dias. Estes autores concluíram que o status ovariano no momento da primeira e segunda dose do análogo de PGF2 α eram diferentes, resultando em momentos distintos do intervalo da segunda dose até o estro. Os dados do presente estudo corroboram essa conclusão.

A literatura é consistente em afirmar que as respostas em tempo da manifestação estral e intervalo de ovulação desde a administração da prostaglandina podem ser devidas as características no padrão das ondas foliculares verificadas no momento dessa aplicação. De fato, o desenvolvimento folicular ovariano em ovelhas ocorre num padrão ovulatório com três a quatro ondas por intervalo entre as ovulações que podem ocorrer de quatro a cinco dias do ciclo estral (Bartlewski et al., 2011).

A emergência folicular refere-se ao crescimento de um novo grupo de folículos antrais de forma coordenada, o crescimento contínuo do folículo dominante e regressão dos subordinados (Driancourt et al., 2001). O surgimento da primeira onda pode ocorrer no dia um, com um folículo ovulatório originário desta onda se estivesse em crescimento e o surgimento da onda 3 do dia três ao dia quatro, com folículo ovulatório desta onda, após a luteólise induzida com PGF2 α no dia cinco ou nove do ciclo estral de ovelhas (Viñoles et al., 1998). Da mesma forma que folículos

dominantes maiores e CL menor no momento da $\text{PGF2}\alpha$ determinou o início do estro, pico de E2 e de LH mais precoces (Murtaza et al., 2019).

Wiley et al. (1997) observaram que a indução da luteólise com $\text{PGF2}\alpha$ não resultou em diferenças no diâmetro do folículo ovulatório e nem na concentração esteroidogênica do fluido folicular (de P4 ou estradiol), mas à análise microscópica de folículos recuperados por laparoscopia em ovelhas, observou-se menos camadas de células da granulosa, resultando em um ciclo estral mais longo quando comparados com ovelhas que tiveram luteólise natural, relacionados com o declínio mais rápido e mais lento da P4, respectivamente.

Os níveis séricos maiores de P4 parece controlar o aumento periódico das concentrações séricas de FSH com consequente aumento no número de ondas foliculares em ovelhas (Baby et al., 2011), refletindo no crescimento, proliferação de células da granulosa, maturação dos folículos, na qualidade folicular e pode reduzir o número de folículos recrutados para a onda ovulatória (Fierro et al., 2011).

Os achados do presente estudo em comparação às demais pesquisas com protocolos de sincronização distintos denotam que no dia 7,5 após a segunda dose de $\text{PGF2}\alpha$ havia mais folículos menores que 3,5 mm em todas as fêmeas e menos folículos médios ($\geq 3,5 - 4,49$ mm). Driancourt. (2001) estabeleceu que folículos maiores que 4,0 mm possuem receptores de LH, podendo ser responsivos à hCG (Fernandez et al., 2018).

Mais recentemente, Vergani et al. (2020) sugeriram que folículos $\geq 3,5$ mm podem desenvolver tecido lúteo em resposta à gonadotrofina, pois eles encontraram relação entre a porcentagem de ovelhas que desenvolveram CL acessório com a porcentagem de ovelhas com folículos $\geq 3,5$ mm no momento da aplicação. Gonçalves et al. (2024) ao analisarem o número de folículos médios em ovelhas Morada Nova sincronizadas com MAP, $\text{PGF2}\alpha$ e eCG, observaram maior número de folículos médios no dia da administração da hCG (7,5 dias após a retirada do MAP), semelhante ao que Vergani et al. (2020) reportam com o mesmo protocolo (média de 1,4 e 1,9 folículos, respectivamente).

Em ovelhas tratadas com hCG há formação de CLa acompanhada de um aumento progressivo na concentração de P4 como resultante do aumento da área de tecido luteal (Catalano et al., 2015; Fonseca et al., 2018; Vergani et al., 2020) que nesta pesquisa apresentou efeito isolado maior para o grupo tratado com hCG.

Os efeitos luteotróficos da administração da hCG no CL original foram observados após três dias com aumento na área, diâmetro e no volume, durante a fase lútea inicial (Gonçalves et al., 2024). Esses aumentos foram seguidos por diminuição no dia 21,5 para as ovelhas que se tornaram prenhes. No presente estudo foi observado efeito isolado para grupo e dia, e como esperado, tendo valores menores no dia 7,5 para todas as variáveis, já que a hCG não havia causado efeito.

Informações sobre a dinâmica ovariana, sinais de color Doppler e heterogeneidade de pixel luteal após a utilização da hCG em ovelhas, principalmente em ovelhas Morada Nova, são limitadas. Sabe-se que os efeitos luteotróficos da hCG são demonstrados na porcentagem de vascularização, no volume e na área vascular, especialmente em fêmeas prenhes e tratadas, sugerindo ação vasoativa da gonadotrofina. Essa inferência encontra sustentação no fato de que há receptores de LH/hCG em vasos uterinos e ovarianos, bem como no próprio corpo lúteo (Wulff et al., 2001; Ziecik et al., 2007).

Além disso, o CL possui fatores reguladores do crescimento de células do endotélio vascular, como os mediadores da angiogênese luteal, o fator de crescimento do endotélio vascular (VGFG) e a angiopoietina 1 (AGNPT1) (Acosta et al., 2004; Woad et al., 2016). Esses fatores são importantes para a avaliação da funcionalidade do tecido lúteo relativa à produção de P4 (Figueira et al., 2015) e eles podem estar presentes em concentrações maiores nas fêmeas prenhes e naquelas tratadas com hCG (Vergani et al., 2020; Rodrigues et al., 2022; Gonçalves et al., 2024).

Em vacas, os valores médios de pixel lúteo não apresentaram alteração durante todo o ciclo estral, mas foram menores quando as concentrações de P4 estavam mais altas, demonstrando uma correlação negativa entre os parâmetros. Já a heterogeneidade foi menor no diestro, demonstrando correlação negativa com a P4. Em cabras, os valores médios e heterogeneidade de pixel lúteo permaneceram constantes em fêmeas prenhes e menores ao longo dos dias naquelas não prenhes, o que é esperado devido a regressão luteal (Siqueira et al., 2009; Trevizan et al., 2018). Em nosso estudo os valores médios e de heterogeneidade permaneceram constantes, mas curiosamente, foi observado um valor maior para a ecotextura no último dia de avaliação ultrassonográfica (D 19,5) podendo estar relacionado à presença de fêmeas prenhes, uma vez que a ecotextura diminui em fêmeas não prenhes.

Pesquisas recentes demonstraram taxas de prenhez em ovelhas Morada Nova sincronizadas com protocolos distintos associados com a hCG semelhante aos grupos não tratados após monta natural (Vergani et al., 2020; Gonçalves et al., 2024). Evidencia-se a necessidade de maior número de fêmeas para observar maior efeito e mais estudos para confirmar se o intervalo de administração da hCG pode ser mais eficiente associado ao protocolo de sincronização com o análogo de PGF2 α além de correlacionar os achados com níveis de P4, taxa de prolificidade e peso ao nascimento dos cordeiros para melhor interpretar os resultados.

5 Conclusão

Conclui-se que fêmeas sincronizadas com intervalo de 7,5 entre as aplicações de cloprostenol sódico manifestaram estro mais cedo e que quando esse grupo recebeu suplementação com hCG houve um aumento no número de corpos lúteos. As variáveis do desempenho reprodutivo de ovelhas Morada Nova durante a estação de monta não diferiram entre as fêmeas sincronizadas com duas aplicações de PGF2 α com intervalos de 7,5 ou 11,5 associados ou não com hCG no dia 7,5 após segunda dose do cloprostenol sódico.

Agradecimentos

Agradecemos a Embrapa Pecuária Sudeste (Rodovia Washington Luiz, Km 234 s/nº, Fazenda Canchim, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil) pela estrutura concedida para realização desta pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Declaração de Contribuição do Autor

Todos os autores contribuíram para este artigo. RKTA: avaliações, metodologia, análise estatística e redação do manuscrito. GBV: análise estatística. JDG: coleta de dados e metodologia. VSAP: coleta de dados e metodologia. RM: coleta de dados, metodologia e redação do manuscrito. MEFO: metodologia, análise estatística e redação do manuscrito. JFF: metodologia e redação do manuscrito.

Declaração de Interesses Concorrentes

Nenhum dos autores tem qualquer conflito de interesse a declarar.

6 Referências

- Acosta, T.J., Miyamoto, A., 2004. Vascular control of ovarian function: Ovulation, corpus luteum formation and regression, in: *Anim. Reprod. Sci.* pp. 127–140. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.022>.
- Acritopoulou, S., Haresign, W., 1980. Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF-2 given at different stages of the oestrous cycle. *Reproduction*. 58, 219–223. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0580219>.
- Cam, A., M., Kuran, M., 2004. Effects of a single injection of hCG or GnRH agonist on day 12 post mating on fetal growth and reproductive performance of sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 80, 81–90. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00158-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00158-1).
- Baby, T.E., Bartlewski, P.M., 2011. Progesterone as the driving regulatory force behind serum FSH concentrations and antral follicular development in cycling ewes. *Reprod. Fertil. Develop.* 23, 303–310. <https://doi.org/10.1071/RD10121>.
- Balaro, M.F.A., da Fonseca, J.F., Oba, E., da Cruz Cardoso, E., Brandão, F.Z., 2014. Is the Santa Inês sheep a typical non-seasonal breeder in the Brazilian Southeast? *Trop. Anim. Health Prod.* 46, 1533–1537. <https://doi.org/10.1007/S11250-014-0672-8/TABLES/1>.
- Bartlewski, P.M., Baby, T.E., Giffin, J.L., 2011. Reproductive cycles in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 259–268. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2011.02.024>.
- Boland, Y.M.P., Gordon, I., Kelleher, A.D.L., 1978. The effect of treatment by prostaglandin analogue (ICI-80, 996) or progestagen (SC-9880) on ovulation and fertilization in cyclic ewes, *J. Agric. Sci. Camb.* 91, 727 – 730.
- Bonato, G.C., Maia, A.L.R.S., Côrtes, L.R., Oliveira, T.A., Arrais, A.M., Figueira, L.M., Oliveira, M.E.F., Souza-Fabjan, J.M.G., Fonseca, J.F., 2019. Effects of d-cloprostenol administrations with 7.5 and 11.5-day intervals between administrations on pregnancy rates after artificial insemination in estrous cyclic dairy goats. *Anim. Reprod. Sci.* 209, 106-172. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106172>.
- Carvalho-de-Paula, C.J., Souza-Fabjan, J.M.G., Gonçalves, J.D., Dias, J.H., de Souza, G.N., Oliveira, M.E.F., Fonseca, J.F., 2020. Effect of a 12-h increment in the short-term treatment regimen on ovarian status, estrus synchrony, and pregnancy rate in artificially inseminated dairy goats. *Anim. Reprod. Sci.* 221, 106571. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106571>.
- Catalano, R., Teruel, M., González, C., Williams, S., Dorna, I.V., Callejas, S., 2015. Reproductive performance of ewe lambs in non-breeding season exposed to hCG at day 12 post mating. *Small Rumin Res.* 124, 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.12.014>.
- Clemente, M., de La Fuente, J., Fair, T., Al Naib, A., Gutierrez-Adan, A., Roche, J.F., Rizos, D., Lonergan, P., 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a

direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction*. 138, 507–17. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0152>.

Coelho, L.A., Rodrigues, P.A., Nonaka, K.O., Sasa, A., Balieiro, J.C.C., Vicente, W.R.R., Cipolla-Neto, J., 2006. Annual pattern of plasma melatonin and progesterone concentrations in hair and wool ewe lambs kept under natural photoperiod at lower latitudes in the southern hemisphere. *J. Pineal. Res.* 41, 101–107. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2006.00333.X>.

Cole, L.A., 2012. hCG, the wonder of today's science. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10, 24. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-24>.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. <https://www.mendeley.com/reference-manager/reader/6a9a736b-c81b-320d-8cb1-5966fe237f41/49bc6fee-72cb-8d51-355b-f54c0dbbd810/> (acessado em 19 de outubro de 2024).

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

Contreras-Solis, I., Vasquez, B., Diaz, T., Letelier, C., Lopez-Sebastian, A., Gonzalez-Bulnes, A., 2009. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect.” *Theriogenology*. 71, 1018–1025. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.11.004>.

Correia Santos, V.J., Garcia Kako Rodriguez, M., del Aguila da Silva, P., Sitta Gomes Mariano, R., Taira, A.R., de Almeida, V.T., Ramirez Uscategui, R.A., Nociti, R.P., Maia Teixeira, P.P., Rossi Feliciano, M.A., Russiano Vicente, W.R., 2018. B-mode ultrasonography and ecobiometric parameters for assessment of embryonic and fetal development in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 197, 193–202. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2018.08.028>.

de Carvalho Menezes de Almeida, S.F., Souza-Fabjan, J.M.G., Balaro, M.F.A., Bragança, G.M., Pinto, P.H.N., de Almeida, J.G., Moura, A.B.B., da Fonseca, J.F., Brandão, F.Z., 2018. Use of two doses of cloprostenol in different intervals for estrus synchronization in hair sheep under tropical conditions. *Trop. Anim. Health Prod.* 50, 427–432. <https://doi.org/10.1007/S11250-017-1454-X/TABLES/2>.

Driancourt, M.A., 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55, 1211–1239. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00479-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00479-4).

Esteves, L.V., Brandão, F.Z., Cruz, R.C., Souza, J.M.G., Oba, E., Facó, O., Fonseca, J.F., 2013. Reproductive parameters of dairy goats submitted to estrus synchronization with prostaglandin F_{2α} associated or not to hCG at estrous onset. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65, 1585–1592. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000600001>.

Fernandez, J., Bruno- Galarraga, M.M., Soto, A.T., de la Sota, R.L., Cueto, M.I., Lacau, I.M., Gibbons, A.E., 2018. Hormonal therapeutic strategy on the induction of accessory

corpora lutea in relation to follicle size and on the increase of progesterone in sheep. *Theriogenology*. 105, 184–188. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.020>.

Fernandez, J., Bruno-Galarraga, M.M., Soto, A.T., de la Sota, R.L., Cueto, M.I., Lacau-Mengido, I.M., Gibbons, A.E., 2019. Effect of GnRH or hCG administration on Day 4 post insemination on reproductive performance in merino sheep of North Patagonia. *Theriogenology*. 126, 63–67. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.12.008>.

Fierro, S., Olivera-Muzante, J., Gil, J., Viñoles, C., 2011a. Effects of prostaglandin administration on ovarian follicular dynamics, conception, prolificacy, and fecundity in sheep. *Theriogenology*. 76, 630–639. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.03.016>.

Fierro, S., Viñoles, C., Olivera-Muzante, J., 2016. Concentrations of steroid hormones, estrous, ovarian and reproductive responses in sheep estrous synchronized with different prostaglandin-based protocols. *Anim. Reprod. Sci.* 167, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.009>.

Figueira, L., Fonseca, J., Arashiro, E., Souza-Fabjan, J., Ribeiro, A., Oba, E., Viana, J., Brandão, F., 2015. Colour Doppler Ultrasonography as a Tool to Assess Luteal Function in Santa Inês Ewes. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 643–650. <https://doi.org/10.1111/rda.12543>.

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

Fonseca, J.F., 2005. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinose caprinos. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/44472/1/AAC-Estrategias-para-o-controle.pdf/> (acessado em 19 de outubro de 2024).

Fonseca, J.F., Maffili, V. V, Santos, A.D.F., Fürst, R., Prospero, C.P., Rovay, H., Souza, J.M.G., Torres, C.A.A., 2012. Effects of prostaglandin administration 10 days apart on reproductive parameters of cyclic dairy nulliparous goats. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v 64, 349–358.

Gonçalves, J.D., Vergani, G.B., Rodrigues, J.N.D., Dias, J.H., Pereira, V.S. do A., Garcia, A.R., Esteves, S.N., Fonseca, J.F. da, Oliveira, M.E.F., 2024. Luteal tissue characteristics of Morada Nova ewes with hCG application 7.5 days after the end of estrus synchronization protocol in the breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* 261, 107396. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107396>.

Gonzalez-Bulnes, A., Veiga-Lopez, A., Garcia, P., Garcia-Garcia, R.M., Ariznavarreta, C., Sanchez, M.A., Tresguerres, J.A.F., Cocero, M.J., Flores, J.M., 2005. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology*. 63, 2523–2534. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.013>.

Houghton, J.A.S., Liberati, N., Schrick, F.N., Townsend, E.C., Dailey, R.A., Inskip, E.K., 1995. Day of estrous cycle affects follicular dynamics after induced luteolysis in ewes. *J. Anim. Sci.* 73, 2094–2101. <https://doi.org/10.2527/1995.7372094x>.

Moraes J.C.F., Souza C.J.H., Jaume C.M., 2005. O uso da avaliação da condição corporal visando máxima eficiência produtiva dos ovinos [WWW Document]. URL https://www.researchgate.net/publication/320386589_O_uso_da_avaliacao_da_condicao_corporal_visando_maxima_eficiencia_produtiva_dos_ovinos/ (acessado em 25 de setembro de 2024).

Khan, T.H., Beck, N.F.G., Khalid, M., 2009. The effect of hCG treatment on Day 12 post-mating on ovarian function and reproductive performance of ewes and ewe lambs. *Anim. Reprod. Sci.* 116, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.01.010>.

Maia, A.L.R.S., Brandão, F.Z., Souza-Fabjan, J.M.G., Balaro, M.F.A., Oliveira, M.E.F., Facó, O., Fonseca, J.F., 2017. Reproductive parameters of dairy goats after receiving two doses of d-cloprostenol at different intervals. *Anim. Reprod. Sci.* 181, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.02.013>.

Menchaca, A., Barrera, N., Dos, P.C., Neto, S., Cuadro, F., Crispo, M., 2016. Advances and limitations of in vitro embryo production in sheep and goats. *Anim. Reprod.*, v 13, 273–278. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR871>.

Menchaca, A., Miller, V., Gil, J., Pinczak, A., Laca, M., Rubianes, E., 2004. Prostaglandin F₂α treatment associated with timed artificial insemination in ewes. *Reprod. Domest. Anim.* 39, 352–355. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2004.00527.X>.

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

Moeini, M. M., Alipour, F., Sanjabi, M. R. 2013. Efficacy of CIDR or FGA Sponges with hCG Treatments on the Conception Rate and Prolificacy in Lori Ewes Out of the Breeding Season, Iran. *J. Appl. Anim. Sci.* <https://www.mendeley.com/reference-manager/reader/4c626df4-1bf1-39f0-b6f9-3e98ebab1917/1619c1ec-87a3-5a4d-0a2d-660079863228/> (acessado em 19 de outubro de 2024).

Murtaza, A., Ahmad, W., Sohail, T., Khan, M.I. ur R., Mohsin, I., Shahzad, M., Hussain, M., Tahir, M.Z., Ijaz, M., 2019. Follicular dynamics and changes in oestradiol-17β, progesterone and LH profiles following PGF₂α induced oestrus in early and late ovulating Beetal goats. *Reprod. Domest. Anim.* 54, 545–550. <https://doi.org/10.1111/RDA.13392>.

Oliveira, M.E.F., Ayres, H., Oliveira, L.G., Barros, F.F.P.C., Oba, E., Bicudo, S.D., Bartlewski, P.M., Fonseca, J.F., Vicente, W.R.R., 2016. Effects of season and ovarian status on the outcome of long-term progesterone-based estrus synchronization protocols and ovulatory follicle development in Santa Inês ewes under subtropical

conditions. *Theriogenology*. 85, 452–460.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.024>.

Rodrigues, J.N.D., Guimarães, J.D., Oliveira, M.E.F., Dias, J.H., Arrais, A.M., de Sousa, M.A.P., Bastos, R., Ahmadi, B., Bartlewski, P.M., Fonseca, J.F., 2022. Human chorionic gonadotropin affects original (ovulatory) and induced (accessory) corpora lutea, progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrus dairy goats. *Reprod. Biol.* 22, 100591. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2021.100591>.

Rodrigues, J.N.D., Guimarães, J.D., Rangel, P.S.C., Oliveira, M.E.F., Brandão, F.Z., Bartlewski, P.M., Fonseca, J.F., 2023. Luteal function in cyclic goats treated with human chorionic gonadotropin administered by intramuscular or intravaginal routes at the time of artificial insemination. *Reprod. Domest. Anim.* 58, 396–404. <https://doi.org/10.1111/rda.14298>.

Rubianes, E., Menchaca, A., Carbajal, B., 2003. Response of the 1–5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2 α . *Anim. Reprod. Sci.* 78, 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00046-0).

Simplício, A. A.; Salles, H., Santos, D. O., Azevedo, H. C. 2001. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos de corte em regiões tropicais [WWW Document]. URL https://www.researchgate.net/publication/283914805_Manejo_reprodutivo_de_caprinos_e_ovinos_de_corte_em_regioes_tropicais/ (acessado em 16 de outubro de 2024).

Siqueira, L.G.B., Torres, C.A.A., Amorim, L.S., Souza, E.D., Camargo, L.S.A., Fernandes, C.A.C., Viana, J.H.M., 2009. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 115, 18–28. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2008.11.009>.

Spencer, T.E., Ott, T.L., Bazer, F.W., 1996. Interferon: Pregnancy Recognition Signal in Ruminants.

Texeira, T.A., da Fonseca, J.F., de Souza-Fabjan, J.M.G., de Rezende Carvalheira, L., de Moura Fernandes, D.A., Brandão, F.Z., 2016. Efficiency of different hormonal treatments for estrus synchronization in tropical Santa Inês sheep. *Trop Anim Health Prod* 48, 545–51. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0989-y>.

Trevizan, J.T., Nociti, R.P., Pedrosa, A.C., Brair, V.L., Oliveira, I.C., Balaro, M.F.A., Maia, A.L.R.S., Prastes, J.F., Brandão, F.Z., Fonseca, J.F., Oliveira, M.E., 2018. Use of hCG, eCG or p-FSH on estrus induction of goats and their effects on luteal dynamics and conception rate 15, 324.

Vázquez, M.I., Blanch, M.S., Alanis, G.A., Chaves, M.A., Gonzalez-Bulnes, A., 2010. Effects of treatment with a prostaglandin analogue on developmental dynamics and functionality of induced corpora lutea in goats. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 42–7. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.05.016>.

Vergani, G.B., Fonseca, J.F. da, Trevizan, J.T., Pereira, V.S. do A., Garcia, A.R., Esteves, S.N., Brandão, F.Z., Souza-Fabjan, J.M.G., Oliveira, M.E.F., 2020. Luteotropic effects of human chorionic gonadotropin administered 7.5 days after

synchronous estrous induction in Morada Nova ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 223, 106644. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106644>.

Vilariño, M., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P.C., García-Pintos, C., Menchaca, A., 2017. Time of ovulation and pregnancy outcomes obtained with the prostaglandin-based protocol Synchrovine for FTAI in sheep. *Theriogenology*. 90, 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.003>.

Viñoles, C., Rubianes, E., 1998. Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. *Can. J. Anim. Sci.* 429–431.

Wiley, T.M., Cárdenas, H., Pope, W.F., 1997. Effect of the rate of progesterone decline at luteolysis on the ovulatory follicles and subsequent estrous cycle length in ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 46, 79–87. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(96\)01602-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(96)01602-8).

Woad, K.J., Robinson, R.S., 2016. Luteal angiogenesis and its control. *Theriogenology* 86, 221–228. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.035>.

Wulff, C., Dickson, S.E., Duncan, W.C., Fraser, H.M., 2001. Angiogenesis in the human corpus luteum: simulated early pregnancy by HCG treatment is associated with both angiogenesis and vessel stabilization. *Hum. Reprod.* 16, 2515–24. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.12.2515>.

Ziecik, A.J., Kaczmarek, M.M., Blitek, A., Kowalczyk, A.E., Li, X., Rahman, N.A., 2007. Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 269, 51–60. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2006.08.016>.

Tabela 1. Dados (média \pm SEM ou %) para variáveis reprodutivas de ovelhas Morada Nova cíclicas que receberam duas doses de 150 μ g de cloprostenol sódico em intervalos de 7,5 ou 11,5 dias para sincronização do estro e receberam 300 UI de hCG ou 1 mL de solução salina nos 7,5 dias após a segunda dose de PGF2 α .

Variáveis	G_{PG - 7,5sal}	G_{PG - 7,5hCG}	G_{PG - 11,5sal}	G_{PG - 11,5hCG}	p - value
Ovelhas em estro (%)	86,9 (20/23)	91,6 (22/24)	86 (20/23)	70,8 (17/24)	0,4
Intervalo até o estro (h)*	49,2 \pm 2,7 ^{ab}	45,8 \pm 2,5 ^a	58,6 \pm 3,5 ^b	56,5 \pm 3,1 ^b	0,009
Taxa de prenhez (%)	69,5 (16/23)	70,8 (17/24)	66,7(16/24)	60,9 (14/23)	1,00

*horas após segunda de PGF2 α ; Abreviaturas: G_{PG- 7,5sal}: grupo prostaglandina 7,5 salina; G_{PG - 11,5sal}: grupo prostaglandina 11,5 salina; G_{PG - 7,5hCG}: grupo prostaglandina 7,5 hCG; G_{PG - 11,5hCG}: grupo prostaglandina 11,5 hCG; N^o: números. p < 0,05 (Teste de Tukey).

Tabela 2. Dados (média \pm SEM ou %) para variáveis reprodutivas de ovelhas Morada Nova cíclicas que receberam duas doses de 150 μ g de cloprostenol sódico em intervalos de 7,5 ou 11,5 dias para sincronização do estro e receberam 300 UI de hCG ou 1 mL de solução salina nos 7,5 dias após a segunda dose de PGF2 α .

Variáveis	GPG - 7,5sal	GPG - 7,5hCG	GPG - 11,5sal	GPG - 11,5sal	p - value
Folículos \leq 3,49 mm/ovelha (%) no dia 7,5 após 2 ^a dose de PGF2 α	80 (12/15)	92,8 (13/14)	83,3 (10/12)	92,8 (13/14)	-
Folículos 3,50 - 4,49 mm/ovelha (%) no dia 7,5 após 2 ^a dose de PGF2 α	53,3 (8/15)	42,8 (6/14)	33,3 (4/12)	21,4 (3/14)	-
Folículos 4,50 - 5,49 mm/ovelha (%) no dia 7,5 após 2 ^a dose de PGF2 α	46,6 (7/15)	28,5 (4/14)	50 (6/12)	57,1 (8/14)	-
Folículos $>$ 5,50 mm/ovelha (%) no dia 7,5 após 2 ^a dose de PGF2 α	26,6 (4/15)	7,14 (1/14)	25 (3/12)	7,14 (1/14)	-
N ^o de folículos totais no dia 7,5	3,6 \pm 0,47	4,2 \pm 0,66	3,6 \pm 0,42	3,8 \pm 0,43	0.70
N ^o de folículos $<$ 3,49 mm no dia 7,5	1,9 \pm 0,45	2,8 \pm 0,39	2,1 \pm 0,48	2,7 \pm 0,42	0.35
N ^o de folículos 3,50 - 4,49 mm no dia 7,5	0,6 \pm 0,21	0,7 \pm 0,27	0,5 \pm 0,23	0,3 \pm 0,16	0.51
N ^o de folículos 4,50 - 5,49 mm no dia 7,5	0,5 \pm 0,17	0,3 \pm 0,18	0,5 \pm 0,15	0,6 \pm 0,17	0.76
N ^o de folículos $>$ 5,50 mm no dia 7,5	0,5 \pm 0,22	0,07 \pm 0,07	0,2 \pm 0,13	0,07 \pm 0,07	0.14
Diâmetro do maior folículo no dia 7,5	4,8 \pm 0,32	4,2 \pm 0,24	5,0 \pm 0,28	4,5 \pm 0,25	0.18
Número de ovulações (n)	1,33 \pm 0,12	1,85 \pm 0,15	1,50 \pm 0,17	1,58 \pm 0,19	0.34

Abreviaturas: GPG- 7,5sal: grupo prostaglandina 7,5 salina; GPG - 11,5sal: grupo prostaglandina 11,5 salina; GPG - 7,5hCG: grupo prostaglandina 7,5 hCG; GPG - 11,5hCG: grupo prostaglandina 11,5 hCG; N^o: números. $p < 0,05$ (Teste de Tukey).

Legenda de figuras

Figura 1. Desenho experimental para avaliação da sincronização do estro com duas doses de 150 µg de um análogo de prostaglandina com intervalos de 7,5 e 11,5 dias e o efeito luteotrófico de 300 UI de hCG ou 1 mL de solução salina no dia 7,5 após a segunda dose da PGF2α, em ovelhas Morada Nova cíclicas. µg: micrograma; i.m: intramuscular; MN: Monta natural; CLs: Corpos lúteos; Dg: Diagnóstico de gestação.

Figura 2. Média (± SEM) do número de corpos lúteos (A), diâmetro (B), área (C) e volume do tecido luteal (D) nos dias 7,5 10,5, 13,5, 16,5 e 19,5 após sincronização com duas doses de PGF2α com intervalo de 7,5 e 11,5 dias e administração de 300 UI de hCG (hCG) ou 1mL de solução salina (salina) nos 7,5 dias após a segunda dose de PGF2α em ovelhas Morada Nova cíclicas. Colchetes verticais seguidos de letras, referem-se à diferença significativa entre os tratamentos e horizontais à diferença significativa nos dias de avaliações ultrassonográficas.

Figura 3. Média (± SEM) da área luteal total do color Doppler (A), área luteal do color Doppler (B) e volume total do color Doppler (C) nos dias 7,5, 10,5, 13,5, 16,5 e 19,5 após sincronização com duas doses de PGF2α com intervalo de 7,5 ou 11,5 dias e administração de 300 UI de hCG (hCG) ou 1mL de solução salina (salina) nos 7,5 dias após a segunda dose de PGF2α em ovelhas Morada Nova cíclicas. Colchetes verticais seguidos de letras, referem-se à diferença significativa entre os tratamentos e horizontais à diferença significativa nos dias de avaliações ultrassonográficas

Figura 4. Média (± SEM) dos valores dos pixels numéricos (A) e da heterogeneidade dos pixels lúteos (B) nos dias 7,5, 10,5, 13,5, 16,5 e 19,5 de ovelhas Morada Nova sincronizadas com duas doses de PGF2α com intervalo de 7,5 ou 11,5 dias tratadas com 300 UI de hCG (hCG) ou 1mL de solução salina (salina) nos 7,5 dias após a segunda dose de PGF2α em ovelhas Morada Nova cíclicas. Colchetes verticais seguidos de letras, referem-se à diferença significativa entre os tratamentos e horizontais à diferença significativa nos dias de avaliações ultrassonográficas

Figura 1:

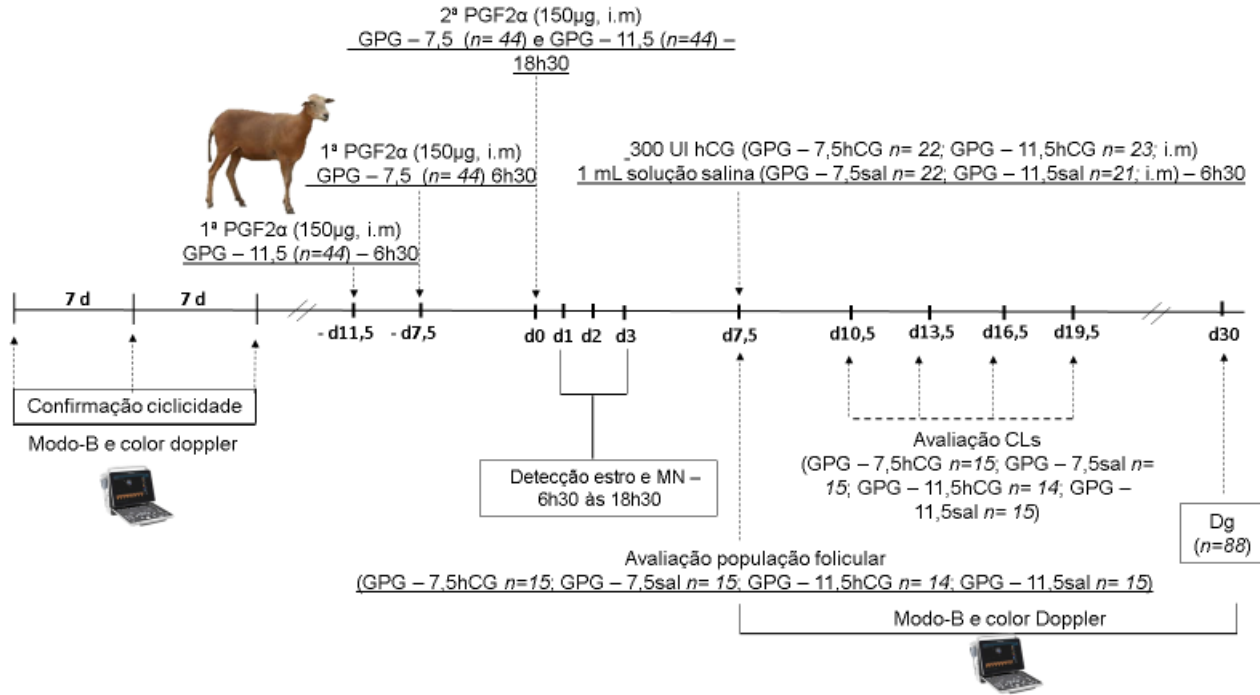


Figura 2:

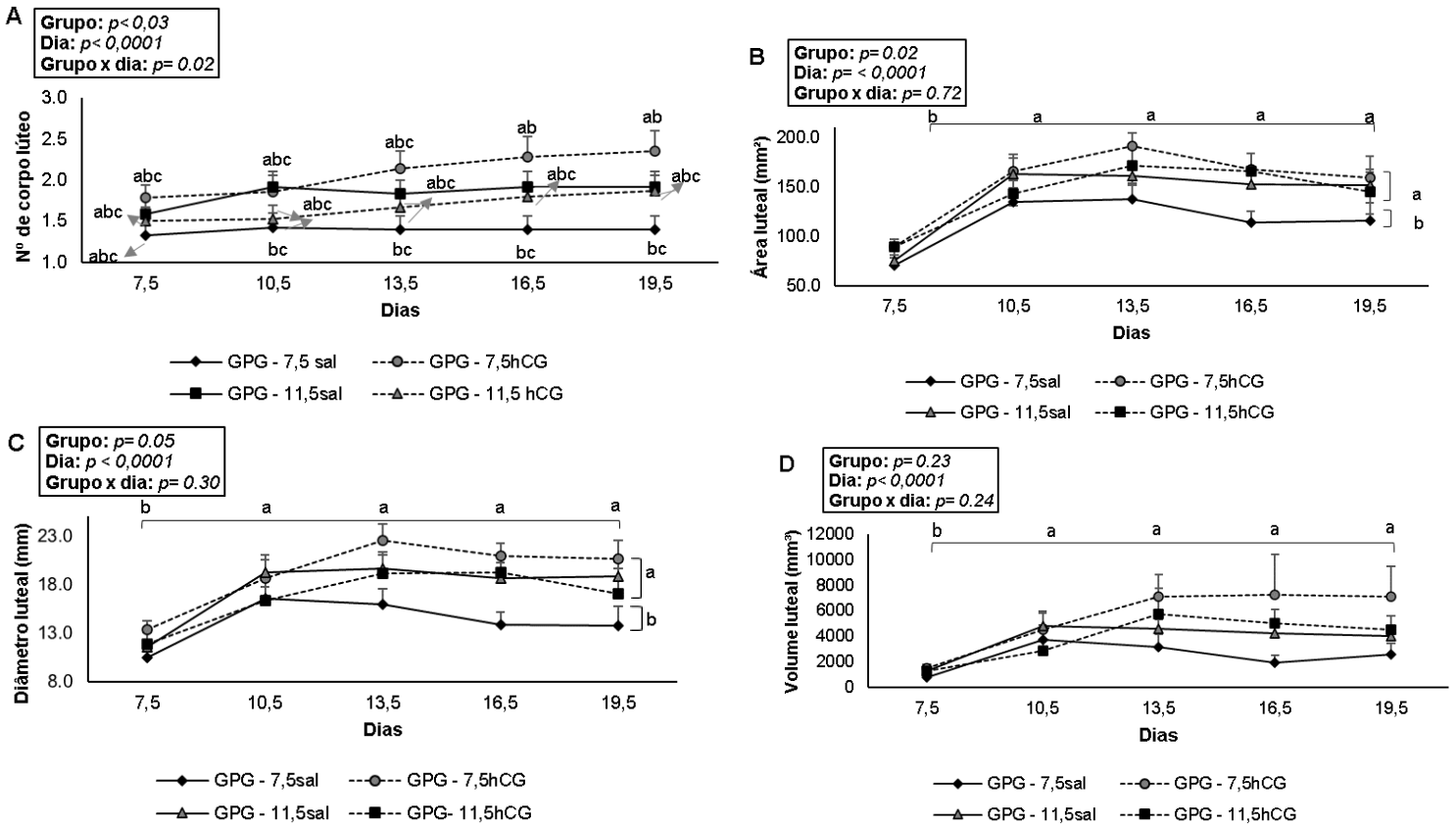


Figura 3:

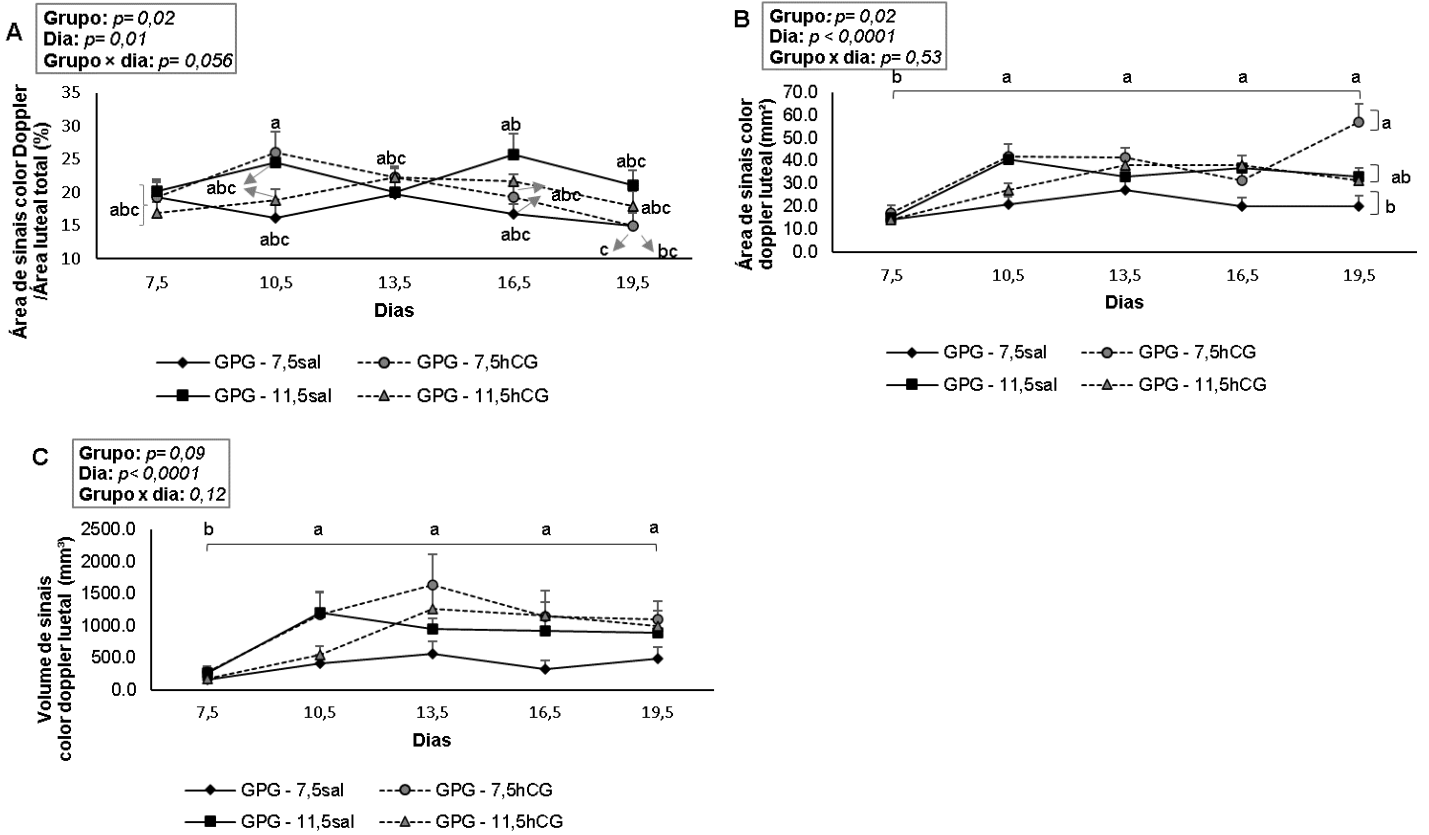


Figura 4:

