

**ALICE LIMA MARTINS**

**PARÂMETROS LUTEAIS E ENDÓCRINOS DE CABRAS ACÍCLICAS  
SUBMETIDAS À INDUÇÃO DE ESTRO SINCRONIZADO E RECEBENDO OU  
NÃO hCG POR DIFERENTES VIAS NO SÉTIMO DIA DO CICLO ESTRAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Jeferson Ferreira da Fonseca

Coorientadores: Ana Lúcia Rosa e Silva Maia  
Bruna Waddington de Freitas  
Luiz Gustavo Bruno Siqueira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M386p  
2024  
Martins, Alice Lima, 1997-  
Parâmetros luteais e endócrinos de cabras acíclicas submetidas à indução de estro sincronizado e recebendo ou não hCG por diferentes vias no sétimo dia do ciclo estral / Alice Lima Martins. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (71 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Jeferson Ferreira da Fonseca.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Medicina Veterinária, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.289>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Caprinos - Reprodução. 2. Corpo lúteo. 3. Gonadotrofina coriônica. 4. Progesterona. 5. Ovários - Ultrassonografia. I. Fonseca, Jeferson Ferreira da, 1972-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Medicina Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.390824

**ALICE LIMA MARTINS**

**PARÂMETROS LUTEAIS E ENDÓCRINOS DE CABRAS ACÍCLICAS  
SUBMETIDAS À INDUÇÃO DE ESTRO SINCRONIZADO E RECEBENDO OU  
NÃO hCG POR DIFERENTES VIAS NO SÉTIMO DIA DO CICLO ESTRAL**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de Fevereiro de 2024.

Assentimento:



Documento assinado digitalmente

ALICE LIMA MARTINS

Data: 21/07/2024 19:52:13-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Alice Lima Martins  
Autora



Documento assinado digitalmente

JEFERSON FERREIRA DA FONSECA

Data: 22/07/2024 08:03:59-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Jeferson Ferreira da Fonseca  
Orientador

*Dedico este estudo aos meus pais,  
irmãos, sobrinhos e ao meu amor João.  
Obrigada por todo apoio e  
compreensão.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tantas bênçãos que Ele proporciona em minha vida, por me guardar e guiar durante essa trajetória, por proteger e abençoar meus entes queridos durante minha ausência e por ter colocado tantas pessoas de bom coração no meu caminho.

Aos meus pais, Joaquim e Maria, por todo amor e cuidado durante toda a minha vida. Vocês são minha maior inspiração de vida, amor e companheirismo, serei eternamente grata pelos pais que Deus me deu. Amo vocês com todo meu coração!

As minhas irmãs, Aline e Adriana e ao meu irmão Alexssandre, por todo apoio, cuidado, amor e companheirismo que sempre tivemos uns com os outros, e que mesmo distantes se fazem tão presentes. Tenho certeza que não seria nem a metade de mim se não fosse por vocês. Amo vocês eternamente!

As minhas sobrinhas, Letícia, Natália, Aléxia, Luna e Laiza e ao meu sobrinho Caio, que são o meu maior orgulho e o amor da vida da titia, vocês alegam meus dias. Amo vocês até a lua (ida e volta)!

Ao meu amor João Vitor, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e dando seu amor incondicional. Obrigada por ser meu melhor amigo, companheiro e maior incentivador. Te amo!

A todos meus familiares, por sempre me apoiarem, me incentivarem, por terem contribuído muito para a minha educação e formação como pessoa, e por todos momentos felizes que me proporcionaram ao longo da vida. Amo vocês!

Ao meu orientador Jeferson Ferreira da Fonseca que me recebeu de braços abertos, sempre muito compreensivo e disposto a ensinar. Obrigada!

A professora e coorientadora Bruna Waddington de Freitas, pela amizade e pelos conselhos de sempre. Fazer parte da equipe Labran com certeza deixou mais leve esse caminho. Obrigada por todo apoio e incentivo de sempre. Você é a melhor!

Aos meus coorientadores Ana Lúcia Rosa e Silva Maia e Luiz Gustavo Bruno Siqueira, que sempre com paciência me transmitiram muito conhecimento.

À toda equipe que a Embrapa/Jeferson me proporcionou, em especial, a minha amiga do coração Jenniffer Hauschildt Dias, que me incentivou a entrar

em contato com o Dr. Jeferson e me apoio sempre que precisei nessa jornada, ao Paulo Sergio Cerqueira Rangel, que me socorreu com as análises estatísticas e com meus “surto” em todos os momentos necessários (obrigada pela amizade Paulo), a Juliana Nascimento Duarte Rodrigues que sempre me transmitiu muito conhecimento e me apoiou quando mais precisava (finalmente esse parto aconteceu haha), a Luana Rangel Côrtes que me ajudou na execução do experimento, sempre muito solícita, ao Gabriel Brun Vergani que mesmo distante estava sempre disposto a responder minhas dúvidas, ao Professor Felipe Zandonadi Brandão, pelas dosagens hormonais.

A todos os estagiários(as) da Embrapa Gado de Leite, em especial, a Mariana Garcia, a Signet Vieira, a Fabiana Goncalves, a Layane Ferreira e a Isabela Pedrosa, por terem me ajudado durante a excussão do experimento, obrigada pela amizade, por todas conversas, risadas e por deixaram mais leves os dias cansativos de trabalho.

A todos funcionários da Embrapa Gado de Leite que me receberam tão bem, sempre com um sorriso no rosto, em especial, ao Juarez e ao sr. Chico que me ajudaram na excussão do experimento e que cuidam tão bem das nossas cabrinhas e ovelhinhas, sem vocês eu nada disso seria possível. Um obrigada especial também para o Salvati, Raymundo, dona Deusa, Dodó e sr. Amarildo, pelas inúmeras horas de conversas, trocas de conhecimento e vários cafezinhos (haha), vocês tornaram tudo mais leve e feliz, vão estar sempre guardados no meu coração.

As pessoas incríveis que conheci durante esse tempo em Coronel Pacheco e que vou levar pra sempre comigo, Rafael Bolina, Mariana Brito, Jean Marcelo, Denise Okano, Luiz Felipe, Saulo, Dani, Sabrina, Alina, Laura Alice, Anaclara, vocês com certeza fizeram meus dias mais felizes. Obrigada!

Aos amigos que Viçosa me deu, Gabriela Freitas, que dividiu o apartamento comigo e que juntas fizemos dele um “lar”, a Júlia Parisi, Luisa, Stéfany, Ana Clara, companheiras de Labran, a Gabrielle Soares, Pedro Henrique, Issac, Vívian, obrigada a todos por me proporcionam muitos momentos de alegria e descontração. Sempre vão estar em meu coração!

As minhas queridas amigas Alice e Vanessinha, que durante este tempo sempre se fizeram presentes, me ajudando e apoiando quando mais precisei. Amo vocês!

E a tantas outras pessoas queridas que não vou conseguir escrever aqui, saiba que sou grata, por cada uma que me ajudou, me apoiou e se lembrou de mim.

Aos animais, “minhas cabrinhas”, não apenas por terem participado deste estudo, mas por serem a peça principal do meu estudo e dedicação à Medicina Veterinária.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação, e a todos professores e colaboradores, desde os envolvidos no processo seletivo, que sempre proporcionaram um ambiente agradável durante estes dois anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

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

Ao Laboratório Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade (LMBS Embrapa Gado de Leite) pelo provimento de animais, instalações, e funcionários indispensáveis à realização desse estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Projeto 4039092021-0) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Projetos CVZ-PPM 00201-17 e BPD-00308-22), pelo suporte financeiro e concessão da bolsa de estudos.

*"O conhecimento é uma arma poderosa  
que pode transformar o mundo."*

(Malala Yousafzai)

## RESUMO

MARTINS, Alice Lima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Parâmetros luteais e endócrinos de cabras acíclicas submetidas à indução de estro sincronizado e recebendo ou não hCG por diferentes vias no sétimo dia do ciclo estral.** Orientador: Jeferson Ferreira da Fonseca. Coorientadores: Ana Lúcia Rosa e Silva Maia, Bruna Waddington de Freitas e Luiz Gustavo Bruno Siqueira.

Este estudo teve como propósito avaliar a eficácia da administração de 300 UI de hCG por diferentes vias em parâmetros luteais e séricos de cabras leiteiras em anestro fisiológico. Utilizaram-se 31 animais distribuídos em três grupos: hCG-IU (n = 8), que receberam 300 UI de hCG via intrauterina transcervical (i.u); hCG-IM (n = 11), que receberam 300 UI de hCG via intramuscular (i.m); e o grupo controle (n = 12), que receberam 1 mL de solução salina i.m. Todos os grupos foram submetidos a um protocolo de indução de estro sincronizado com esponjas intravaginais contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona mantidas por seis dias, seguido por 200 UI de eCG e 131,5 µg de cloprostenol i.m. 24:00 horas antes da remoção da esponja. Realizaram-se ultrassonografias transretais para avaliações luteais nos dias 4, 7, 8, 10, 13, 17 e 21 (D0 = início do estro), com coletas de sangue para mensuração de progesterona e hCG sérico. No D21, o grupo hCG-IU apresentou uma maior contagem ( $P < 0,05$ ) de corpos lúteos (CL) em comparação com o grupo controle. Corpos lúteos acessórios (CLa) foram detectados nos grupos hCG-IU e hCG-IM (2/8; 25,0% e 7/11; 63,6%, respectivamente) ( $P < 0,05$ ). A área luteal total (TLA) aumentou no grupo hCG-IM entre os D13 e D17 ( $P < 0,05$ ). A área vascular (AV) foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo hCG-IU no D13. As concentrações médias de hCG não diferiram entre os grupos ( $P > 0,05$ ) em D7. No grupo hCG-IM, as concentrações médias de hCG aumentaram ( $P < 0,05$ ) em D7,5 e mantiveram-se assim até o D8. Não houve diferenças ( $P > 0,05$ ) nas concentrações médias de P4 circulante entre os três grupos de cabras. As taxas de gestação no D30 foram similares ( $P > 0,05$ ) entre os grupos hCG-IM e controle (91,0% ou 10/11 e 83,0% ou 10/12, respectivamente) e ambas foram superiores ( $P < 0,05$ ) ao hCG-IU (25,0% ou 2/8). Embora todas as vias tenham influenciado na formação de CLa's, a via intrauterina acelerou de maneira singular a formação de CLa e aumentou a vascularização luteal no D13. No entanto, esses resultados distintos não

resultaram em maiores taxas de gestação quando comparados com outras vias de administração.

Palavras-chave: Caprino, Corpo lúteo, Gonadotrofina coriônica humana, Progesterona, Ultrassonografia ovariana.

## ABSTRACT

MARTINS, Alice Lima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2024. **Luteal and endocrine parameters of synchronous estrus induced acyclic goats receiving or not hCG by different routes seven days after estrus onset.** Adviser: Jeferson Ferreira da Fonseca. Co-advisers: Ana Lúcia Rosa e Silva Maia, Bruna Waddington de Freitas and Luiz Gustavo Bruno Siqueira.

This study evaluated the effects of hCG administered by different routes on luteal and serum parameters in acyclic dairy goats. A total of 44 goats were subjected to synchronous estrus induction with intravaginal sponges containing 60 mg of medroxyprogesterone acetate for six days plus 200 IU of recombinant eCG and 131.5 µg of cloprostenol i.m. 24:00 h before sponge removal. Goats in received 300 hCG via intrauterine transcervical (hCG-IU, n= 8), intramuscular (hCG-IM, n= 11), or 1 mL saline solution intramuscular (Control group, n= 12). Transrectal ultrasonography and blood collection were performed on days 4, 7, 8, 10, 13, 17, and 21 (D0 = start of estrus). On D21, the hCG-IU group showed a higher count ( $P<0.05$ ) of corpora lutea (CL) compared to the control group. Accessory corpora lutea (CLa) were detected in the hCG-IU and hCG-IM groups (2/8; 25.0% and 7/11; 63.6%, respectively) ( $P<0.05$ ). Total luteal area (TLA) increased in the hCG-IM group between D13 and D17 ( $P< 0.05$ ). Vascular area (AV) was higher ( $P<0.05$ ) in the hCG-IU group on D13. Mean hCG concentrations did not differ between groups ( $P>0.05$ ) on D7. In the hCG-IM group, mean hCG concentrations increased ( $P<0.05$ ) on D7.5 and remained so until D8. Serum P4 were similar ( $P>0.05$ ) among the three goat groups. Pregnancy rates on D30 were similar ( $P>0.05$ ) between the hCG-IM and control groups (91.0% or 10/11 and 83.0% or 10/12, respectively) and both were higher ( $P<0.05$ ) than hCG-IU (25.0% or 2/8). Administration of hCG intrauterine is not recommended.

Keywords: Goat, Corpus luteum, Human Chorionic Gonadotropin, Progesterone, Ovarian Ultrasonography.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figure 1 - Experimental design of the study. Effects of intrauterine administration of hCG seven days after estrus on luteal and plasma parameters of dairy goats in physiological anestrus submitted to synchronized estrus induction. Goats received 300 IU hCG or 1 mL of saline. Females were allocated randomly to the three groups immediately after estrus detection. Jugular blood samples were drawn, and B-mode and color Doppler the goats received 300 IU hCG or 1 mL of saline on day 7. US: transrectal ovarian ultrasonography; MAP: medroxyprogesterone acetate (progestin)-soaked sponges..... 65
- Figure 2 - Mean and S.E.M of number of CL (n) in dairy goats in physiological anestrus subjected to synchronized estrus induction, with or without intrauterine administration of 300 IU of hCG seven days after the onset of behavioral estrus ..... 66
- Figure 3 - Mean and S.E.M of luteal area (mm<sup>2</sup>) in dairy goats in physiological anestrus subjected to synchronized estrus induction, with or without intrauterine administration of 300 IU of hCG seven days after the onset of behavioral estrus. .... 67
- Figure 4 - Mean and S.E.M of Doppler area (mm<sup>2</sup>) in dairy goats in physiological anestrus subjected to synchronized estrus induction, with or without intrauterine administration of 300 IU of hCG seven days after the onset of behavioral estrus. .... 68
- Figure 5 - Mean and S.E.M of serum hCG concentration (ng/mL) in dairy goats in physiological anestrus subjected to synchronized estrus induction, with or without intrauterine administration of 300 IU of hCG seven days after the onset of behavioral estrus..... 69
- Figure 6 - Mean and S.E.M of serum P4 concentration (ng/mL) in dairy goats in physiological anestrus subjected to synchronized estrus induction, with or without intrauterine administration of 300 IU of hCG seven days after the onset of behavioral estrus..... 70

## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1.</b> Reproductive parameters (% or mean $\pm$ SEM) of acyclic dairy goats subjected to synchronous estrus induction protocol and receiving 300 IU of hCG by transcervical intrauterine (IU) or intramuscular (IM) or saline IM (Control) at Day 7 estrous cycle (Day 0= day of estrous onset).....	62
---	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
3 $\beta$ HSD	3 $\beta$ -hidroxiesteroide-desidrogenase
AI	Artificial insemination
BCS	Body condition score (Escore de condição corporal)
BW	Body weight (peso corporal)
CL	Corpo Lúteo
Cla	Corpo Lúteo acessório
Clo	Corpo Lúteo original
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
eCG	Gonadotropina coriônica equina
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
et al.	E colaboradores
FSH	Hormônio folículo-estimulante
G	Gramas
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
H	Hora
hCG	Gonadotropina coriônica humana
i.m	Intramuscular
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IATFx	Inseminação Artificial em Tempo flexível
IRIE	Intravaginal device removal to estrus
Kg	Quilograma
LH	Hormônio luteinizante
MAP	Acetato de Medroxiprogesterona
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mm <sup>2</sup>	Milímetros quadrados
N	Número amostral
P4	Progesterona
P450scc	Citocromo P-450 de clivagem da cadeia lateral do colesterol
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
RIA	Radioimmunoassay (radioimunoensaio)
RNAm	RNA mensageiro

STARs	Proteína regulatória aguda esteroideogênica
TE	Transferência de Embrião
UI	Unidades Internacionais
US	Ultrassonografia
Mg	Micrograma

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1 Ciclo estral e estacionalidade reprodutiva dos caprinos .....	17
2.2 Ciclo folicular ovariano .....	19
2.2.1 <i>Dinâmica folicular</i> .....	19
2.2.2 <i>Dinâmica luteal, corpo lúteo e progesterona</i> .....	21
2.3 Estratégias para indução de estro sincronizado em cabras .....	24
2.3.1 <i>Utilização da hCG</i> .....	25
2.3.2 <i>Vias de administração da hCG</i> .....	27
3. HIPÓTESE .....	30
4. OBJETIVOS .....	30
4.1 Objetivo geral .....	30
4.2 Objetivos específicos .....	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31
6. CAPÍTULO 1 (Manuscrito).....	41
7. Anexo.....	71

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma tradição sólida na criação de caprinos e ovinos, atividades que desempenham um papel crucial na sustentação econômica e nutricional de muitas famílias de baixa renda (Sorio, 2017). O rebanho caprino brasileiro atinge uma estimativa de aproximadamente 12 milhões de cabeças, sendo que 95,21% desses caprinos estão localizados na região Nordeste (IBGE, 2021). Por outro lado, embora a região Sudeste que abrigue apenas 1,24% do rebanho nacional (IBGE, 2021), a região tem destacada referência na produção de leite de cabra. Tal destaque é atribuído ao sistema intensivo de produção e ao perfil genético de animais especializados na produção de leite nessa região (Lopes et al., 2012; Lôbo et al., 2017). Contudo, a marcante estacionalidade reprodutiva da espécie nessa região (Balaro et al., 2019) enfraquece a cadeia produtiva do leite e seus derivados devido à ocorrência de partos concentrados em uma única época do ano. Diante desse cenário, o uso de metodologias para indução de estro sincronizado durante os períodos em que esses animais não apresentam atividade reprodutiva (Fonseca et al., 2019) torna-se crucial para aumentar a rentabilidade produtiva.

A utilização de protocolos hormonais objetiva um grande percentual de animais em estro e em um curto período (Carvalho de Paula et al., 2020). Entretanto, as concentrações séricas de progesterona (P4) em animais submetidos à indução de estro sincronizado na estação não reprodutiva são inferiores às aquelas encontradas em fêmeas cíclicas de ovinos (Rhind et al., 1978; Theodosiadou et al., 2004) e caprinos (Błaszczuk et al., 2004). Isso impossibilita a formação de um ambiente apropriado para o estabelecimento e manutenção da gestação, prejudicando diretamente o desenvolvimento do concepto (Lonergan et al., 2016; Forde e Lonergan, 2017).

Isso poderia ser corrigido em parte com a elevação da concentração de P4 na forma de suplementação exógena ou endógena, com a administração de agentes luteotróficos. A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é um hormônio proteico sintetizado pelo sinciciotrofoblasto da placenta de mulheres (Handschuh et al., 2007), que apresenta maior afinidade por receptores de LH (80%), rápida absorção e meia-vida longa (Khan et al., 2007; Saleh et al., 2012). A hCG pode

ser utilizada para indução de corpos lúteos acessórios (CLa; Côrtes et al., 2021; Rodrigues et al., 2022) e promover hipertrofia dos corpos lúteos originais por sua ação luteotrófica (Rodrigues et al., 2022), elevando a concentração de P4 circulante (Fonseca et al., 2018; Rodrigues et al., 2022) e aumentando as taxas de gestação em cabras (Côrtes et al., 2021; Bustamante-Andrade et al., 2021; Rodrigues et al., 2022).

Geralmente, a via preferencial para a administração de hCG é a intramuscular. A via intravaginal também foi testada, aproveitando a presença de uma densa rede de vasos sanguíneos permeáveis na mucosa vaginal (Hussain e Ahsan, 2005), o que permite uma rápida absorção dos medicamentos aplicados na corrente sanguínea, resultando em um "efeito de primeira passagem uterina", onde o hormônio administrado é diretamente transportado da vagina para o útero (Bulletti et al., 1997). No entanto, essa via demonstrou ter um efeito limitado na fertilidade de caprinos quando administrada no momento da inseminação artificial (Rodrigues et al., 2023a). Ainda não há relatos na literatura sobre a administração de hCG via intrauterina nessa espécie. Atualmente, os programas de transferência de embriões (TE) em caprinos têm alcançado sucesso tanto por meio de técnicas não cirúrgicas (Morais et al., 2020) quanto por técnicas cirúrgicas, como a laparoscopia (Fonseca et al., 2018), resultando em taxas de sobrevivência embrionária satisfatórias. Em ambas as abordagens, durante o procedimento de TE, é necessária a utilização de uma pequena quantidade de líquido para transportar o embrião até o útero, oferecendo uma oportunidade ideal para a administração de hCG. Dessa forma, é hipotetizado que a administração intrauterina de hCG possa induzir efeitos luteais e séricos semelhantes àqueles observados com a administração intramuscular.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Ciclo estral e estacionalidade reprodutiva dos caprinos**

A maturidade sexual da fêmea caprina ocorre quando ela atinge 60 a 70% do peso de um animal adulto, o que acontece normalmente entre seis e oito meses de idade (Mobini et al., 2005). As fases do ciclo estral ocorrem devido à

liberação e inibição de hormônios por um processo de retroalimentação. Esses hormônios são liberados pelo hipotálamo, hipófise, ovário e útero e controlam os processos de crescimento folicular até a formação do corpo lúteo (Hafez e Hafez, 2004).

O ciclo estral compreende uma série de modificações morfológicas e fisiológicas que ocorrem no trato genital feminino culminando com o estro e a ovulação. Sua duração é caracterizada como o intervalo entre duas manifestações de estro e, apesar de ser muito variado, em cabras sua duração média é de 21 dias (Ginther e Kot, 1994; De Castro et al., 1999). É dividido em quatro fases: proestro com aproximadamente dois dias; estro, que pode durar de um a dois dias; metaestro e diestro que, conjuntamente, duram aproximadamente 17 dias (Homeida, 1986; Menchaca e Rubianes, 2002; Magalhães et al., 2009).

As variações sazonais na atividade reprodutiva de cabras estão diretamente ligadas ao hormônio melatonina que é produzido em períodos de escuridão pela glândula pineal (Clarke et al., 2009). As taxas de secreção e concentração desse hormônio são interpretadas como um sinal endócrino influenciando na secreção do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), que por sua vez influencia a liberação dos hormônios gonadotróficos luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH) (Barrell et al., 1992).

As cabras são consideradas animais poliéstricos estacionais de dias curtos. Essa influência do fotoperíodo é evidente tanto nos machos quanto nas fêmeas de raças originárias do hemisfério Norte (latitudes altas ou temperadas), que iniciam seu ciclo reprodutivo em função da redução do número de horas de luz ao dia (Chemineau et al., 1992; Traldi et al., 2007; Balaro et al., 2019). No entanto, o início e a duração da estação reprodutiva também estão relacionados a outros fatores como a raça, clima e manejo (Morales et al., 2016; Balaro et al., 2019).

Na região Sudeste do Brasil, as cabras apresentam comportamento reprodutivo tipicamente estacional, com a estação de acasalamento natural ocorrendo do final do verão ao início do inverno (março a junho). O anestro profundo ocorre entre os meses de setembro e novembro, havendo um período

de transição entre elas (Fonseca et al., 2005). Esse padrão foi demonstrado em estudo realizado por Balaro et al. (2019), em que cabras Saanen, primíparas e multíparas, apresentaram estro durante outono e inverno, enquanto nulíparas concentraram a manifestação de estro durante o inverno e, independente da ordem de parto, todas apresentaram anestro durante a primavera.

Por outro lado, animais mantidos em regiões próximas à linha do Equador, como na Região Nordeste do Brasil onde as diferenças de luminosidade são quase imperceptíveis, tendem a manifestar estacionalidade menos marcante, com manifestação de estro ao longo de todo o ano. Nesses locais a raça tem uma implicação importante na ocorrência ou não de estacionalidade reprodutiva (Lopes Junior et al., 2001; Cruz et al., 2005; Oliveira, 2010).

## **2.2 Ciclo folicular ovariano**

Dá-se o nome de ciclo ovariano às alterações estruturais e hormonais em decorrência do crescimento dos folículos, ovulação, luteinização e luteólise (Schillo, 2009). A fase folicular do ciclo ovariano consiste no período no qual o folículo se desenvolve até o estágio ovulatório, ocorrendo um predomínio de liberação dos hormônios estrogênicos estimulados pela ação do FSH e do LH. Já a fase luteal, se caracteriza pela formação do corpo lúteo após a ovulação, estrutura responsável pela síntese da progesterona (Homeida, 1986; Menchaca e Rubianes, 2002; Magalhães et al., 2009; Schillo, 2009).

### *2.2.1 Dinâmica folicular*

Os folículos ovarianos são as unidades funcionais dos ovários, que sustentam o crescimento e maturação do oócito (Cortvrindt e Smitz, 2001) e podem ser classificados de acordo com seu grau de desenvolvimento em: pré-antrais ou não cavitários e antrais ou cavitários (Figueiredo et al., 2001).

O desenvolvimento folicular em cabras evolui em um padrão ondulatório ao longo do ciclo (Ginther e Kot, 1994). Uma onda folicular refere-se a uma sequência de três eventos no crescimento folicular: emergência ou recrutamento, seleção ou desvio e dominância (Ginther et al., 1996). Na emergência somente uma parte dos folículos antrais irão continuar se desenvolvendo até atingirem 4 mm de diâmetro, sendo selecionados e entrando,

portanto, na fase de dominância; estes sob a influência do LH, atingem a fase pré-ovulatória (6-9 mm) (Rubianes e Menchaca, 2003; Uribe-Velásquez et al., 2015).

É estimado que cabras desenvolvam de duas a seis ondas foliculares durante o ciclo estral, com predomínio da ocorrência de três a quatro ondas (Ginther e Kot, 1994; Menchaca e Rubianes, 2002; Medan et al., 2003; Simões et al., 2006; Nogueira et al., 2015). Cada onda folicular possui um folículo dominante e os subordinados. No entanto, em ovinos e caprinos é comum a ocorrência de mais de um folículo dominante, fenômeno conhecido como “codominância” (Rubianes e Menchaca, 2003). A última onda fornece o folículo ovulatório e, na ocorrência de ovulações múltiplas, elas são geralmente de folículos da mesma onda, embora possam derivar de duas ondas foliculares consecutivas (Ginther e Kot, 1994).

A emergência da primeira onda folicular ocorre logo após a ovulação (dia 0 do ciclo estral) e sua emergência ocorre em média no dia 2. A segunda, a terceira e a quarta ondas geralmente ocorrem nos dias 2-5, 6-9 e 10-15, respectivamente, demonstrando em média um intervalo de três a quatro dias entre a emergência de cada onda folicular (Ginther e Kot, 1994). A P4 é retratada com um fator responsável pela ocorrência desse padrão de três ou quatro ondas. Isso ocorre por que a baixa concentração de P4 na fase lútea inicial, durante a primeira onda, acelera o alcance do diâmetro máximo dos folículos, o que antecede a segunda onda e permite a ocorrência de quatro ondas em um mesmo ciclo (Menchaca e Rubianes, 2002).

Além disso, a P4 também possui uma influência sobre o diâmetro máximo alcançado pelo folículo dominante, uma vez que grandes folículos foram observados principalmente na primeira e quarta onda folicular, momento no qual a concentração plasmática de P4 encontra-se mais baixa devido a imaturidade do corpo lúteo ou de sua luteólise (De Castro et al., 1999; Simões et al., 2006; Nogueira et al., 2015).

Previamente a cada onda folicular ocorre uma elevação transitória de FSH, que declina durante o crescimento folicular devido ao aumento na síntese de estradiol e inibina (Medan et al., 2003). Durante a fase folicular, um *pool* de

folículos antrais (2 a 3 mm de diâmetro) é recrutado para entrar em seu crescimento final, de dois a três desses folículos são selecionados para entrar na fase de dominância (4 mm), onde sob a influência do LH, alcançam a fase pré-ovulatória (6 a 9 mm) (Fatet et al., 2011). Nesse momento a concentração de P4 é baixa, o que é fundamental para desencadear os pulsos de LH (Menchaca e Rubianes, 2002; Nogueira et al., 2015). A atresia dos folículos subordinados acontece em resposta à secreção de inibina e aumento da concentração de estradiol secretado pelos folículos maiores. Estes promovem um *feedback* negativo sobre a hipófise, diminuindo a liberação de FSH, e de forma menos intensa, a liberação pulsátil de LH, atuando diretamente no desenvolvimento do folículo dominante e maturação do ovócito até a ocorrência da ovulação (Fatet et al., 2011; Uribe-Velásquez et al., 2015). Após a ovulação, durante a fase luteal as altas concentrações de P4 promovem bloqueio do crescimento e ovulação dos folículos da segunda e terceira onda (Menchaca e Rubianes, 2002).

### *2.2.2 Dinâmica luteal, corpo lúteo e progesterona*

A luteinização é o processo de diferenciação que ocorre imediatamente após a ovulação, onde as células do folículo ovulatório se transformam em células luteais para formar o corpo lúteo (CL) (Fatet et al., 2011). O CL é uma glândula endócrina, temporária e dinâmica (Smith et al., 1994) e suas principais funções são a regulação do ciclo estral e o estabelecimento e manutenção da gestação através da síntese e secreção de P4. Sua função e integridade são especialmente importantes em espécies como a caprina, em que a gestação é estritamente dependente da P4 luteal (Smith et al., 1994; Sangha et al., 2002; Spencer et al., 2015).

Durante o processo de luteinização, as células da granulosa e da teca interna, remanescentes da parede do folículo ovulatório, proliferam e se diferenciam em células lúteas grandes e células lúteas pequenas, respectivamente. Esses tipos celulares se diferenciam esteroideogênica, morfológica e bioquimicamente (Smith et al., 1994; Sangha et al., 2002; Stocco et al., 2007). Tais alterações estruturais e funcionais das células foliculares resultam em uma mudança de secreção, predominantemente, de estradiol para progesterona e, em pequenas quantidades, também secreta prostaglandinas, e

uma variedade de hormônios proteicos como a oxitocina, relaxina, neurofisina-I, vasopressina e inibina (Sangha et al., 2002). Também são observadas células não-esteroidogênicas no CL, como células endoteliais, células musculares lisas, pericitos, fibroblastos, macrófagos, leucócitos e plasmócitos ocasionais, que variam muito em número, estrutura química e função durante o desenvolvimento, diferenciação e regressão do CL (Sharma e Sharma, 1998; Sangha et al., 2002; Stocco et al., 2007).

A luteinização das células da granulosa é controlada pelo pico de LH e pela vascularização, que tem função de transporte de oxigênio, nutrientes e outros fatores (Sangha et al., 2002). O pico de LH primeiramente causa o bloqueio da proliferação celular e, em seguida, a diferenciação de enzimas esteroidogênicas dessas células, que antes tinham como principal produto o estradiol para produzir progesterona (Stocco et al., 2007; Sugino, 2014).

A biossíntese de hormônios esteroides é modulada pela disponibilidade de colesterol e pelo aumento da expressão de proteínas regulatórias e de enzimas esteroidogênicas específicas, tais como STARS (proteína regulatória aguda esteroidogênica), 3 $\beta$ HSD (3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase), P450<sub>scc</sub> (citocromo P-450 de clivagem da cadeia lateral do colesterol) e da redução da expressão da enzima P450-aromatase (Stocco et al., 2007; Sugino, 2014). A conversão do colesterol em pregnenolona é realizada nas mitocôndrias pelo P-450<sub>scc</sub>. A pregnenolona é o precursor para a produção de P4 pela 3 $\beta$ HSD e, logo após a onda de pré-ovulatória de LH, há um aumento nas concentrações de RNAm que codificam essas enzimas, aumentando as taxas de produção de P4 (Smith et al., 1994). A redução da P450-aromatase é fundamental para facilitar a produção de progesterona, visto que essa enzima é uma das responsáveis pela síntese de estrogênio (Sugino, 2014).

Durante a fase lútea a concentração de P4 plasmática aumenta continuamente até o completo desenvolvimento do CL, atingindo valores máximos por volta do dia 14 (Arashiro et al., 2010; Balaro et al., 2017a). Nessa fase, o crescimento folicular dependente de gonadotropina continua, porém os altos níveis de P4 inibem a ovulação (Fatet et al., 2011). Ao final da fase luteal, que ocorre entre os dias 15 ao 17 após o estro, ocorre a diminuição da concentração de P4,

retirando a inibição da secreção dos hormônios gonadotróficos, dando início a uma nova fase folicular (Arashiro et al., 2010).

Ao final da fase lútea, em situações em que não há a presença do conceito, as células endometriais secretam de forma pulsátil a prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), o que induz a luteólise (Arashiro et al., 2010; Fatet et al., 2011). A regressão luteal é marcada por uma queda abrupta na perfusão sanguínea e produção de P4 nas primeiras 24 horas (luteólise funcional), seguida pela regressão morfológica do CL e atingindo níveis basais de P4 (< 1 ng/mL) nas próximas 72 horas (Balaro et al., 2017a).

A presença de um CL funcional é indispensável para os processos de implantação, placentação e crescimento do conceito em ruminantes (Spencer et al., 2015). Algumas características como área vascular de no mínimo 30% e 9 mm de diâmetro devem ser consideradas para classificar o mesmo como funcional em cabras (Arashiro et al., 2010; Balaro et al., 2017b). Entretanto, fatores como o número de ovulações e raça podem ter influência na concentração plasmática de P4 (Fonseca e Torres, 2005; Balaro et al., 2017b). Isso foi demonstrado por Balaro et al. (2017b) em estudo com cabras da raça Saanen, onde animais apresentando dois ou três CL alcançaram maiores concentrações de P4 se comparadas com aquelas de ovulação única ( $10,3 \pm 5,7$  versus  $8,8 \pm 4,8$  ng/mL; respectivamente).

Além disso, estudos recentes observaram uma forte correlação entre o tamanho do CL e a concentração de P4 circulante, demonstrando que a área do tecido lúteo pode ser usada para estimar sua função (Arashiro et al., 2010; Adriyanto et al., 2017; Balaro et al., 2017b). Balaro et al. (2017b) correlacionaram a avaliação da perfusão sanguínea do CL com a concentração de P4 pelo US Doppler colorido com bons resultados. Cosentino et al. (2018) também demonstraram uma forma subjetiva em escores Doppler Colorido (1-4) e modo-B (1-3) para avaliar a funcionalidade luteal relacionada ao diagnóstico de gestação e concluíram que é uma ferramenta eficaz para o diagnóstico precoce da gravidez em cabras no 21<sup>o</sup> e 23<sup>o</sup> dia pós acasalamento, respectivamente.

A produção ineficiente de progesterona por parte do corpo lúteo é uma das causas de perda gestacional, já que esse déficit impossibilita a formação de um ambiente apropriado para estabelecer e manter a gestação, além de prejudicar diretamente o desenvolvimento do concepto (Lonergan et al., 2016; Forde e Lonergan, 2017).

### **2.3 Estratégias para indução de estro sincronizado em cabras**

Com o intuito de aumentar a oferta de leite e carne ao longo do ano e de otimizar o melhoramento genético do rebanho, produtores tem utilizado biotecnologias que permitem a sincronização de estro tanto no anestro sazonal quando na estação reprodutiva (Fonseca e Souza, 2011; Balaro et al., 2017a). Para tais fins, podem ser adotados protocolos com diferentes métodos, naturais (fotoperíodo artificial e efeito macho), artificiais (protocolos hormonais) e ainda a associação dos mesmos (Machado e Simplício, 2001; Moraes et al, 2016).

A sincronização do estro tem como finalidade a concentração do maior número de fêmeas em estro dentro de um intervalo de 24 a 72 horas (Fonseca e Souza, 2011; Fonseca et al., 2014; Balaro et al., 2017a). Na espécie caprina, a sincronização pode ser obtida através do prolongamento da fase lútea por meio do uso de progestágenos associados a outros hormônios, ou ainda pela redução desta fase, com o uso prostaglandinas (PGF<sub>2</sub>α) (Fonseca et al., 2014; Maia et al., 2017). Na estação não reprodutiva (anestro), a utilização de um programa de luz artificial ou administração exógena de melatonina é capaz de induzir o estro, mas não de forma sincronizada. A sincronização pode ser alcançada através do uso de progestágenos associados a gonadotrofinas, como o eCG, hCG e FSH, além do efeito macho (Fonseca et al., 2014; Balaro et al., 2017a).

Existem diferentes protocolos de indução de estro com variações em doses, via de administração, duração do tempo de permanência de progestágeno, momento da aplicação das gonadotrofinas e o uso ou não de prostaglandinas (Fonseca e Souza, 2011). Em meio às diversas vias de utilização dos progestágenos possíveis, o mais relatado é a utilização de dispositivos intravaginais (Fonseca e Souza, 2011). Apesar das variações entre os protocolos, as gonadotrofinas e prostaglandinas geralmente são

administradas 24 a 48 horas antes ou no momento da retirada do dispositivo (Balaro et al., 2017a).

Protocolos de longa exposição a progestágenos são utilizados há muitos anos gerando os efeitos desejados independente da fase do ciclo estral ou estação do ano (Oliveira et al., 2013; Moraes et al., 2016). No entanto, os folículos pré-ovulatórios acabam sendo estimulados durante muito tempo, causando uma perda de qualidade dos ovócitos ovulados, além de aumentar a ocorrência de vaginites e elevar o custo dos protocolos (Fonseca et al., 2007; Cosentino, 2022).

Protocolos utilizando progestágenos por seis dias têm demonstrado elevada eficiência, tanto com relação a taxa de animais em estro, quanto com relação à sincronia e fertilidade (Fonseca et al., 2017). Carvalho-de-Paula et al. (2020), em estudo realizado em cabras leiteiras na estação de anestro, obtiveram excelente resposta de estro (~ 90%) e maior sincronia no tempo de estro entre as fêmeas com protocolo de 6,5 dias, recomendando este protocolo para uso conjunto da técnica de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Esses autores também concluíram que o protocolo de 6 dias é recomendado para Inseminação Artificial em Tempo Flexível (IATFx) em cabras leiteiras quando essas cabras estão localizadas em condições tropicais (Carvalho-de-Paula et al., 2020).

### *2.3.1 Utilização da hCG*

O uso de hormônios luteotróficos em protocolos de indução/sincronização é uma estratégia usada para elevar a concentração de P4. Seu uso pode ser empregado na fase lútea precoce atuando na indução de corpos lúteos acessórios (CLa) e ação luteotrófica sobre o corpo lúteo original (CLO, proveniente do folículo ovulado), e na fase lútea tardia agindo no aumento da função ovariana (crescimento folicular), crescimento do concepto e fixação placentária (Khan et al., 2007; Rodrigues et al., 2022).

O aumento do LH endógeno através da administração de GnRH ou mesmo o suprimento exógeno de pLH ou seus análogos, como o hCG, tem demonstrado elevada eficiência em induzir a formação de CLa (Fonseca et al., 2021). No entanto, foi demonstrado que a aplicação de GnRH pode induzir a

formação CLa não funcionais, conseqüentemente não tendo efeito nas concentrações plasmática de P4 (Fernandez et al., 2019). Já a administração de hCG apresenta algumas vantagens como seu maior efeito sobre os receptores de LH (80% de afinidade), uma rápida absorção e meia vida longa, podendo ser até seis vezes maior que a do GnRH (Khan et al., 2007; Saleh et al., 2012).

Devido a similaridade com o LH, a hCG age sobre os folículos antrais presentes com receptores de LHR e pode induzir a formação de CLas, efeito observado em cabras (Côrtes et al., 2020; Rodrigues et al., 2022) e ovelhas (Farin et al., 1988; Nephew et al., 1991; Fonseca et al., 2018; Vergani et al., 2020). O mecanismo ocorre por meio da estimulação da ruptura folicular e luteogenese ou pela luteinização de folículos antrais (Driancourt, 2001).

Os CLos atingem seu crescimento final no dia 9 do ciclo estral em cabras (Balara et al., 2017c) e no dia 12 em ovelhas (Figueira et al., 2015). Quando a administração de agentes luteotróficos, como a hCG, ocorre antes desse momento, pode auxiliar no crescimento final desses CLs (Rodrigues et al., 2022). O mecanismo envolvido no aumento da área luteal é a conversão de células luteais pequenas em células luteais grandes somado ao aumento de fibroblastos e células vasculares estimulados pela hCG (Farin et al., 1988). Juntamente a isso a elevação da P4 circulante, ocorre inicialmente pelo estímulo da hCG sobre os receptores de LHR nas células luteais pequenas, que são as responsáveis por produzirem mais P4 sob estímulo desse hormônio (Fitz et al., 1982). Posteriormente esse aumento de P4 ocorre devido a hipertrofia da área luteal e maior quantidades de células luteais grandes, que produzem P4 em maior quantidade que as células luteais pequenas (Fitz et al., 1982).

Para que sejam alcançados os efeitos esperados dos agentes luteotróficos, com foco na formação de CLa, a aplicação dos mesmos deve ser feita no momento mais apropriado, havendo a necessidade da presença de folículos responsivos ao LH, seja da primeira ou da segunda onda folicular (Driancourt, 2001; Balara et al., 2017a; Fonseca et al., 2021). Na cabra, o folículo dominante atinge seu diâmetro máximo no sexto dia após ovulação ou sete dias após início do estro (De Castro et al., 1999), indicando que este é o momento mais promissor para a administração da hCG.

Em estudo realizado em cabras, testando o uso da hCG no quinto dia do ciclo estral, não houve aumento da taxa de gestação dos animais tratados. No entanto, a concentração plasmática de P4 foi elevada nos dias 13 e 17 do ciclo estral (Fonseca et al., 2003), confirmando uma ação luteotrófica da hCG na espécie. Vergani et al. (2020), em um estudo avaliando a administração 300 UI de hCG intramuscular no 7,5 dia pós acasalamento em ovelhas, conseguiram induzir CLa e obtiveram uma maior taxa de prenhez, além do aumento no número de cordeiros nascidos.

Cabras Toggenburg submetidas ao tratamento com 300 UI de hCG, sete dias após o estro, foram capazes de desenvolver CLa e melhorar as taxas de prenhez, embora sem aumento na concentração de P4 (Côrtes et al., 2021). Em outro estudo sobre os efeitos da administração de hCG no dia sete do ciclo estral em cabras leiteiras, foi obtido a indução de CLa em 100% das cabras, além de aumento significativo na área luteal total e na área transversal média do CLo no grupo tratado, alcançando também concentrações circulantes de P4 maiores nos dias 13 a 21 (Rodrigues et al., 2022).

A hCG não apenas compartilha uma estrutura equivalente ao LH, mas também exibe similaridade com o FSH, promovendo assim a estimulação ovariana nos níveis das células da teca e dos receptores de FSH nas células da granulosa. Ambos os aspectos exercem uma influência positiva no período crítico do início da gestação, incluindo a implantação do embrião (Giordano et al., 2012). Em cabras multíparas e anovulatórias, a eficácia de uma dose de 300 UI foi evidenciada ao aumentar significativamente a taxa de fecundidade, a área do corpo lúteo e a taxa de implantação embrionária (Bustamante-Andrade et al., 2021). Além disso, a administração de hCG demonstra efeitos diretos no embrião, como o aumento do comprimento e largura do concepto, tanto em bovinos (Rizos et al., 2011) quanto em ovinos (Khan et al., 2007).

### *2.3.2 Vias de administração da hCG*

Diversos estudos ao longo dos anos demonstraram que a administração de hCG pela via intramuscular foi capaz de atingir níveis séricos consideráveis. Em cabras têm se mostrado bastante efetiva, pois foi capaz de atuar no CLo, comprovando uma ação luteotrófica, que resultou no aumento de P4, da prenhez

e formação de CLa, sendo considerada a via de administração mais acertada (Fonseca et al., 2003; Côrtes et al., 2021; Bustamante-Andrade et al., 2021; Rodrigues et al., 2022). Entretanto a aplicação por essa via pode fazer com que os níveis séricos de hCG se apresentem inferiores quando comparados aos níveis teciduais, o que influenciaria no tempo e intensidade da ação biológica do órgão alvo.

Outra alternativa para administração do hCG é a via intravaginal por possuir uma vasta rede de vasos sanguíneos, que permite a passagem de proteínas e peptídeos (Hussain e Ahsam, 2005). Ela apresenta o que é conhecido como “primeiro efeito de passagem uterino”, no qual o hormônio administrado passa diretamente da vagina para o útero. É uma via que possibilita uma fácil administração de medicamentos e como ocorre o desvio do metabolismo de primeira passagem do fígado, os medicamentos são disponibilizados imediatamente na circulação sistêmica (Bulletti et al., 1997). Porém, apesar de ter induzido a formação de CLa essa via apresentou um efeito limitado na fertilidade de caprinos quando administrado no momento da inseminação artificial (Rodrigues et al., 2023a).

A veia útero-ovariana e a artéria ovariana em ruminantes estão localizadas próximas uma da outra, possibilitando a passagem de substâncias como a PGF2 $\alpha$  do útero para o ovário. Acredita-se que a proximidade desses vasos sanguíneos em sentido oposto permita uma certa quantidade de troca devido ao fluxo contrário. Portanto, partindo do princípio de que substâncias produzidas no útero atinjam o ovário por meio desse mecanismo, é possível que a hCG siga o mesmo processo, transformando a via intrauterina estudada por Ginther et al. (1967) em uma possibilidade. Mesmo que não haja literatura descrevendo a administração de hCG por via intrauterina em cabras, essa abordagem foi testada em humanos e demonstrou ser benéfica para a manutenção da gestação nessa espécie (Bienert et al., 2021).

Atualmente, os programas de transferência de embriões (TE) em caprinos têm alcançado sucesso tanto por meio de técnicas não cirúrgicas (Morais et al., 2020) quanto por técnicas cirúrgicas, como a laparoscopia (Fonseca et al., 2018), resultando em taxas de sobrevivência embrionária satisfatórias. Em ambas as abordagens, durante o procedimento de TE, é necessário o uso de uma pequena

quantidade de líquido para transportar o embrião até o útero, proporcionando um momento propício para a administração da hCG.

### **3. HIPÓTESE**

A administração de hCG pela via intrauterina pode evocar efeitos luteais e séricos semelhantes àqueles observados pela via intramuscular em cabras.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo geral**

Viabilizar uma via alternativa para administração de hCG em cabras.

#### **4.2. Objetivos específicos**

(1) Verificar o efeito da administração da hCG por diferentes vias sete dias após o início do estro em cabras sobre a formação de corpos lúteos acessórios (CLa) e seu efeito sob os corpos lúteos originais (CLo);

(2) Detalhar a dinâmica luteal ao longo do estudo nos grupos delineados;

(3) Avaliar o efeito da administração da hCG por diferentes vias sobre as concentração sérica de hCG e progesterona.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIYANTO, A.; RAHMINIWATI, M.; BOEDIONO, A.; MANALU, W. Optimum dose and time of pregnant mare serum gonadotropin. **Small Ruminant Research**, v.149, p.147–153, 2017.

ARASHIRO, E. K.; FONSECA, J. F.; SIQUEIRA, L. G. B.; FERNANDES, C. A.; BRANDÃO, F. Z.; OBA, E.; VIANA, J. H. Assessment of luteal function in goats by ultrasonographic image attribute analysis. **Small Ruminant Research**, v. 94, p.176–179, 2010.

BALARO, M. F. A.; SANTOS, A. S.; MOURA, L. F. G. M.; FONSECA, J. F.; BRANDÃO, F. Z. Luteal dynamic and functionality assessment in dairy goats by luteal blood flow, luteal biometry, and hormonal assay. **Theriogenology**, v. 95, p. 118–126, 2017c.

BALARO, M. F. A.; SANTOS, A. S.; MOURA, L. F. M, FONSECA, J. F.; BRANDÃO, F. Z. Color Doppler ultrasound, does, luteinized-persistent follicle, number of colored pixels, progesterone. **Theriogenology**, v.95, p.118-126, 2017b.

BALARO, M. F. A.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; CÔRTEZ, L. R.; MAIA, A. L. R. S.; UNGERFELD, R.; FONSECA, J. F.; BRANDÃO F. Z. Sincronização e indução do estro em caprinos leiteiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, p. 330-339, 2017a.

BALARO, M. F. A.; DE MELLO, S. G. V.; DA SILVA SANTOS, A.; CAVALCANTI, L. M.; ALMOSNY, N. R. P.; FONSECA, J. F.; BRANDÃO, F. Z. Reproductive seasonality in Saanen goats kept under tropical conditions. **Tropical Animal Health and Production**, v.51, n.2, p.345-353, 2019.

BARRELL, G.K.; MOENTER, S. M.; CARATY, A.; KARSCH, F, J. Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.46, p.1130–1135, 1992.

BIENERT, M.; HABIB, P.; BUCK, V.; CLASSEN-LINKE, I.; SKOBLO, R.; RÖSING, B. Intrauterine hCG application increases expression of endothelial cell–

cell adhesion molecules in human. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 304, p. 1587–1597, 2021.

BLASZCZYK, B., UDALA, J.; GAŃCZARZEWICZ, D. Changes in estradiol, progesterone, melatonin, prolactin and thyroxine concentrations in blood plasma of goats following induced estrus in and outside the natural breeding season. **Small Ruminant Research**, v. 51, p. 209–219, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00190-1](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00190-1).

BULLETTI, C.; ZIEGLER, D.; GIACOMUCCI, E.; POLLI, V.; ROSSI, S.; ALFIERI, S.; FLAMIGNI, C. Vaginal Drug Delivery: The First Uterine Pass Effect. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 828, n. 1, p. 285–290, 1997.

BUSTAMANTE-ANDRADE, J. A.; MEZA-HERRERA, C. A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, R.; SANTOS-JIMENEZ, Z.; ÁNGELGARCÍA, O.; GAYTÁN-ALEMÁN, L. R.; GUTIERREZ-GUZMAN, U. N.; ESQUIVEL-ROMO, A.; VÉLIZ-DERAS, F. G. Luteogenesis and Embryo Implantation Are Enhanced by Exogenous hCG in Goats Subjected to an Outof-Season Fixed-Time Artificial Insemination Protocol. **Biology**, v.10, p.429, 2021.

CARVALHO-DE-PAULA, C. J.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; GONÇALVES, J. D.; DIAS, J. H.; SOUZA, G. N.; OLIVEIRA, M. E. F.; FONSECA, J. F. 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. **Animal Reproduction Science**, v. 221, n. August, p. 106571, 2020.

CHEMINEAU, P.; MALPAUX, B.; DELGADILLO, J. A.; RAVAUULT, J. P.; THIMONIER, J.; PELLETIER, J. Control of sheep and goat reproduction: Use of light and melatonin. **Animal Reproduction Science**, v. 30, p. 157–184, 1992.

CLARKE, J. I.; SMITH, J. T.; CARATY, A.; GOODMAN, R. L.; LEHMAN, M. N. Kisspeptin and seasonality in sheep. **Peptides**, v. 30, p. 154–163, 2009.

CÔRTEZ, L. R.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; DIAS, D. S.; MARTINS, B. B.; MAIA, A. L. R. S.; VEIGA, M. O.; ARASHIRO, E. K. N.; BRANDÃO, F. Z.; OLIVEIRA, M. E. F.; BARTLEWSKI, P. M.; FONSECA, J. F. Administration of a single dose of 300 IU of human chorionic gonadotropin seven days after the onset of estrus improves pregnancy rate in dairy goats by an unknown mechanism.

**Domestic Animal Endocrinology**, v. 66, n. 1, p. 50–62, 2021.

CORTVRINDT R. & SMITZ J. In vitro Follicle Growth: Achievements in Mammalian Species. **Reproduction Domestic Animal**. v. 36. p. 3 -9, 2001.

COSENTINO, I. O.; BALARO, M. F. A.; LEAL, F. S. C.; CARVALHO, A. B. S.; SOUZA, P. R. C.; ARASHIRO, E. K. N.; BRANDÃO, F. Z. Accuracy of assessment of luteal morphology and luteal blood flow for prediction of early pregnancy in goats. **Theriogenology**, v. 121, p. 104–111, 1 nov. 2018.

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

DE CASTRO, T.; RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; RIVERO, A. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. **Theriogenology**, v. 52, n. 3, p. 399-411, 1999.

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

FARIN, C. E.; MOELLER, C. L.; MAYAN, H.; GAMBONI, F.; SAWYER, H. R.; NISWENDER, G. D. Effect of Luteinizing Hormone and Human Chorionic Gonadotropin on Cell Populations in the Ovine Corpus Luteum. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 2, p. 413–421, 1 mar. 1988.

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

FERNANDEZ, J.; BRUNO-GALARRAGA, M. M.; SOTO, A. T.; LA SOTA, R. L.; CUETO, M. I.; LACAU-MENGIDO, I. M.; GIBBONS, A. E. Effect of GnRH or hCG administration on Day 4 post insemination on reproductive performance in Merino sheep of North Patagonia. **Theriogenology**, v. 126, p. 63–67, 2019.

FIGUEIRA, L. M.; FONSECA, J. F.; ARASHIRO, E. K. N.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; RIBEIRO, A. C. S.; OBA, E.; VIANA, J. H. M.; BRANDÃO, F. Z. Colour Doppler Ultrasonography as a Tool to Assess Luteal Function in Santa Inês

Ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 4, p. 643–650, 2015.

FIGUEIREDO J.R.; RODRIGUES A.P.R. & AMORIM C.A. 2002. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Préantrais – MOIFOPA, p. 227-256. In: Golsalves P.B.D., Figueiredo J.R. & Freitas V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Livraria Varela, São Paulo.

FITZ, T. A.; MAYAN, M. H.; SAWYER, H. R.; NISWENDER, G. D. Characterization of Two Steroidogenic Cell Types in the Ovine Corpus Luteum. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 3, p. 703–711, 1 out. 1982.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; MAFFILI, V. V.; RODRIGUES, M. T.; GUIMARÃES, J. D.; ROVAY, H.; SANTOS, A. D. F.; MATTEDI, C. C. Concentração plasmática de progesterona (P4) de cabras em lactação tratadas com hCG durante a estação de acasalamento natural. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, 2003.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A. Administration of hCG 5 days after breeding and reproductive performance in nulliparous dairy goats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 495–499, 2005.

FONSECA, J. F.; BRUSCHI, J. H.; ZAMBRINI, F. N.; DEMCZUK, E.; VIANA, J. H. M.; PALHÃO, M. P. Induction of synchronized estrus in dairy goats with different gonadotrophins. **Animal Reproduction**, v.2, n.1, p.50–53, 2005.

FONSECA, J. F.; SOUZA, J. M. G.; BRUSCHI, J. H. Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. In: **Simpósio de Caprinos e Ovinos da EVU-FMG**. Belo Horizonte, 2007, p. 167–194.

FONSECA, J. F.; SOUZA, J. M. G. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos. In: 5º SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE - 5º SINCORTE. Anais. **5º Simpósio Internacional Sobre Caprinos e Ovinos de Corte**. João Pessoa, 2011, p. 1-20.

FONSECA, J. F.; CRUZ, R. C.; OLIVEIRA, M.E.F.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; VIANA, J.H.M. **Bioteχνologias Aplicadas à Reprodução de Ovinos e Caprinos**. 1 Ed. Brasília, DF: EMBRAPA, p. 108, 2014.

FONSECA, J. F.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; OLIVEIRA, M.E.F.; CRUZ, R.C.;

ESTEVEES, L.V.; DE PAIVA, M.P.S.L.M.; BRANDÃO, F.Z.; MANCIO, A.B. Evaluation of cervical mucus and reproductive efficiency of seasonally anovular dairy goats after short-term progestogen-based estrous induction protocols with different gonadotropins. **Reproductive Biology**, v. 17, n. 4, p. 363–369, 2017.

FONSECA, J. F.; CASTRO, A. C. R.; ARASHIRO, E. K. N.; OLIVEIRA, M. E. F.; ZAMBRINI, F. N.; ESTEVES, L. V.; BRANDÃO, F. Z.; SOUZA-FABJAN, J. M. G. Effects of hCG administration on accessory corpus luteum formation and progesterone production in estrous-induced nulliparous Santa Inês ewes. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 2, p. 135–139, 2018.

FONSECA, J. F.; VERGANI, G. B.; CÔRTEZ, L. R.; RODRIGUES, J. N. D.; SIQUEIRA, L. G. B.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; OLIVEIRA, M. E. F. Induction of accessory corpus luteum in goats and sheep: From physiological basis to reproductive effects. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 45, n. 4, p. 309–317, 2021.

FORDE, N.; LONERGAN, P. Interferon-tau and fertility in ruminants. **Reproduction**, v.154, n.5, p.33-43, 2017.

GINTHER, O. J. Local utero-ovarian relationships. University of Wisconsin, Madison, **Journal of Animal Science**, v. 26, p. 578–585, 1967.

GINTHER, O. J.; KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology**, v. 42, n. 6, p. 987-1001, 1994.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GIORDANO, J. O.; FRICKE, P. M.; GUENTHER, J. N.; LOPES, G.; HERLIHY, M. M.; NASCIMENTO, A. B. Effect of progesterone on magnitude of the luteinizing hormone surge induced by two different doses of gonadotropin-releasing hormone in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 95, p. 3781–3793, 2012.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação oocitária e ovulação. **Reprodução Animal**, v. 7, p. 69-82, 2004.

HANDSCHUH, K.; GUIBOURDENCHE, J.; TSATSARIS, V.; GUESNON, M.; LAURENDEAU, I.; EVAÏN-BRION, D.; FOURNIER, T. Human Chorionic Gonadotropin Produced by the Invasive Trophoblast But Not the Villous Trophoblast Promotes Cell Invasion and Is Down-Regulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ . **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 5011–5019, 1 out. 2007.

HUSSAIN, A.; AHSAN, F. The vagina as a route for systemic drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 2, p. 301–313, mar. 2005.

HOMEIDA, A. M. Role of oxytocin during the oestrus cycle of ruminants with particular reference to the goats. **Animal Breed**, v.54, p. 263-268, 1986.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa da Pecuária Municipal -Tabela 3939: Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho**. 2021. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>. Acesso em: 08 de fevereiro de 2023.

KHAN, T. H.; BECK, N. F. G.; KHALID, M. The effects of GnRH analogue (buserelin) or hCG (Chorulon) on Day 12 of pregnancy on ovarian function, plasma hormone concentrations, conceptus growth and placentation in ewes and ewe lambs. **Animal Reproduction Science**, v. 102, n. 3-4, p. 247-257, 2007.

LÔBO, A.M.B.O.; LÔBO, R.N.B.; FACÓ, O.; SOUZA, V.; ALVES, A.A.C.; COSTA, A.C.; ALBUQUERQUE, M.A.M. Characterization of milk production and composition of four exotic goat breeds in Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 153, p. 9-16, 2017.

LONERGAN, P.; FORDE, N.; SPENCER, T. Role of progesterone in embryo development in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 2, p. 66-74, 2016.

LOPES, F. B.; DA SILVA, M. C.; MIYAGI, E. S.; FIORAVANTI, M. C. S.; FACÓ, O.; GUIMARÃES, R. F.; DE C. JÚNIOR, O. A.; MCMANUS, C. M. Spatialization of climate, physical and socioeconomic factors that affect the dairy goat production in Brazil and their impact on animal breeding decisions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 1073–1081. 2012.

LOPES JUNIOR, E. S.; RONDINA, D.; SIMPLÍCIO, A. A.; FREITAS, V. J. F. Oestrus behaviour and performance in vivo of Saanen goats raised in northeast of Brazil. **Livestock Research for Rural Development**, v.13, n.6, p.1-10, 2001.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Avaliação de programas hormonais para a indução e sincronização do estro em caprinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.1, p. 171–178. 2001.

MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D. D.; ARAUJO, V. R.; ALMEIDA, A. P.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R. Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese *in vivo e in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.171-182. 2009.

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. Reproductive parameters of dairy goats after receiving two doses of d-cloprostenol at different intervals. **Animal Reproduction Science**, v.181, p.16–23, 2017.

MEDAN, M. S.; WATANABE, G.; SASAKI, K.; SHARAWY, S.; GROOME, N. P.; TAYA, K. Ovarian dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins, ovarian steroids, and inhibin during the estrous cycle in goats. **Biology of reproduction**, v.69, p. 57– 63, 2003.

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

MORAIS, M. C. C.; ESTEVES, L. V.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; OLIVEIRA, M. E. F.; SILVA, M. R.; BRANDÃO, F. Z.; FONSECA, J. F. Factors affecting pregnancy rates for goat embryos recovered and transferred by transcervical route. **Small Ruminant Research**, v.192, 2020.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C. J. H.; GONÇALVES, P. B. D.; FREITAS, V. J. F.; LOPES JÚNIOR, E. Controle do Estro e da Ovulação em Ruminantes. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2nd ed. São Paulo: Roca; p.p. 395p. cap. 3, p 33–56. 2016.

MORALES, J.U., NIETO, C.A.R., ÁVILA, H.R.V., MANJARRES, E.V.A. Resumption of ovarian activity is modified by non-photoperiodic environmental cues in Criollo goats in tropical latitudes, **Small Ruminant Research**, v. 137, p. 9–16, 2016.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL-NRC. **Nutrient requirements of Small Ruminants**. Washington, DC: [s.n.].

NEPHEW, K. P.; MCCLURE, K. E.; OTT, T. L.; DUBOIS, D. H.; BAZER, F. W.; POPE, W. F. Relationship between variation in conceptus development and differences in estrous cycle duration in ewes. **Biology of Reproduction**, v. 44, n. 3, p. 536–539, 1 mar. 1991.

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

OLIVEIRA, M. E. F.; BARTLEWSKI, P. M.; FELICIANO, M. A. R. Controle do Ciclo Estral. **Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos**. 1st ed. São Paulo: MedVet; p. p.p. 305p. cap. 7, 71–90. 2013.

OLIVEIRA, R. M. P. **Comportamento sexual de cabras Toggenburg durante a estação reprodutiva após luteólise natural ou induzida**. 2010. 223 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

RHIND, S. M., CHESWORTH, J. M., ROBINSON, J. J., 1978. A seasonal difference in ovine peripheral plasma prolactin and progesterone concentrations in early pregnancy and in 5 the relationship between the two hormones. **Journal of Reproduction and Fertility**, 52, 79-81.

RIZOS, D.; SCULLY, S.; KELLY, A. K.; EALY, A. D.; MOROS, R.; DUFFY, P. A. L.; NAIB, A.; FORDE, N.; LONERGAN, P. Effects of human chorionic gonadotrophin administration on Day 5 after oestrus on corpus luteum characteristics, circulating progesterone and conceptus elongation in cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v.24, p.472-481, 2011.

RODRIGUES, J. N. D.; GUIMARÃES, J. D.; RANGEL, P. S. C.; OLIVEIRA, M. E. F.; BRANDÃO, F. Z.; BARTLEWSKI, P. M.; FONSECA, J. F. Ovarian function and pregnancy rates in dairy goats that received 300 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) intravaginally at the time of artificial insemination. **Small Ruminant Research**, v. 227, p. 107061, 2023b.

RODRIGUES, J. N. D.; GUIMARÃES, J. D.; RANGEL, P. S. C.; OLIVEIRA, M. E. F.; BRANDÃO, F. Z.; BARTLEWSKI, P. M.; FONSECA, J. F. Luteal function in cyclic goats treated with human chorionic gonadotropin administered by intramuscular or intravaginal routes at the time of artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, 00, 1–9.2023a.

RODRIGUES, J. N. D.; GUIMARÃES, J. D.; OLIVEIRA, M. E. F.; DIAS, J. H.; ARRAIS, A. M.; SOUSA, M. A. P.; BASTOS, R.; AHMADIF, B.; BARTLEWSKI, P. M.; FONSECA, J. F. Human chorionic gonadotropin affects original (ovulatory) and induced (accessory) corpora lutea, progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous dairy goats. **Reproductive Biology**, v. 22, n. 1, p. 100591, mar. 2022.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Animal Reproduction Science**. v. 5, 2003.

SALEH, M.; SHAHIN, M.; WUTTKE, W.; GAULY, M.; HOLTZ, W. Pharmacokinetics of human chorionic gonadotropin after i.m. administration in goats (*Capra hircus*). **Reproduction research**, v. 144, p. 77–81, 2012.

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

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

SIMÕES, J.; ALMEIDA, J.C.; VALENTIM, R.; BARIL, G.; AZEVEDO, J.; FONTES, P.; MASCARENHAS, R. Follicular dynamics in Serrana goats. **Animal Reproduction Science**, v. 95, n. 1-2, p. 16-26, 2006.

SMITH, M. F.; MCINTUSH, E.V.; SMITH, G.W. Mechanisms associated with corpus luteum development. **Journal of Animal Science**, v.72, n.7, p.1857-1872, 1994.

SORIO, A. Diagnóstico da oferta e demanda de ovinos e caprinos para processamento de carne, pele e leite na região central do Tocantins. Tocantins: **Triunfal**, 2017.

SPENCER, T. E.; FORDE, N.; LONERGAN, P. The role of progesterone and conceptus derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. **Journal Dairy Science**, v. 99, p. 5941–5950, 2015.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. **Endocrine Reviews**, v.28, p.117–149, 2007.

SUGINO, N. Molecular mechanisms of luteinization. **Obstetrics & Gynecology Science**, v.57, p.93 – 101, 2014.

THEODOSIADOU, E.; GOULAS, P.; KOUSKOURA, T. H.; SMOKOVITIS, A. Oestrogen and progesterone concentrations in plasma and oviductal tissue of ewes exhibiting a natural or induced oestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 59-67, 2004.

TRALDI, A. S.; LOUREIRO, M. F. P.; CAPEZZUTO, A.; MAZORRA, A. L. Métodos de controle da atividade reprodutiva em caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p. 254-260, 2007.

VERGANI, G. B.; FONSECA, J. F.; TREVIZAN, J. T.; PEREIRA, V. S. A.; GARCIA, A. R.; ESTEVES, S. N.; BRANDÃO, F. Z.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; OLIVEIRA, M. E. F. Lutetropic effects of human chorionic gonadotropin administered 7.5 days after synchronous estrous induction in Morada Nova ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 223, p. 1–10, 2020.

URIBE-VELÁSQUEZ, L. F.; LENZ SOUZA, M. I.; NARVÁEZ-SOLARTE, W. Follicular development in Alpine goats during the mating season. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v.10, n.1, p.38-44. 2015.

## 6. CAPÍTULO 1 (Manuscrito)

### **Effects of intrauterine administration of hCG seven days after estrus on luteal and seric parameters of dairy goats in physiological anestrus submitted to synchronized estrus induction**

Alice Lima Martins<sup>1</sup>; Luana Rangel Côrtes<sup>1</sup>, Juliana Nascimento Duarte Rodrigues<sup>2</sup>;  
Paulo Sergio Cerqueira Rangel<sup>1</sup>; Ana Lucia Rosa e Silva Maia<sup>3</sup>; Felipe Zandonadi  
Brandão<sup>3</sup>, Luiz Gustavo Bruno Siqueira<sup>4</sup>; Bruna Waddington<sup>1</sup>, Jeferson Ferreira  
Fonseca<sup>5</sup>

*<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brazil*

*<sup>2</sup>Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus Paragominas, Rodovia PA-256, s/n, CEP 68627-451, Paragominas, PA, Brazil*

*<sup>3</sup>Faculty of Veterinary, Fluminense Federal University, Av. Vital Brasil Filho, 64, CEP 24230-340, Niterói, RJ, Brazil*

*<sup>4</sup>Embrapa Gado de Leite, Av. Eugênio do Nascimento, 610, CEP 36038-330, Juiz de Fora, MG, Brazil.*

*<sup>5</sup>Embrapa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral/Groaúras, km 04, CP 145, CEP 62010-970, Sobral, CE, Brazil.*

\*Correspondence: Jeferson Ferreira da Fonseca, Embrapa Caprinos e Ovinos, Rodovia MG 133, Km 42, Cep 36155-000, Coronel Pacheco, MG, Brazil. Email: [jeferson.fonseca@embrapa.br](mailto:jeferson.fonseca@embrapa.br)

**Abstract**

This study evaluated the effects of hCG administered by different routes on luteal and serum parameters in acyclic dairy goats. A total of ??? goats were subjected to synchronous estrus induction with intravaginal sponges containing 60 mg of medroxyprogesterone acetate for six days plus 200 IU of recombinant eCG and 131.5 µg of cloprostenol i.m. 24:00 h before sponge removal. Goats in received 300 hCG via intrauterine transcervical (hCG, n=8), intramuscular (hCG-IM, n = 11), or 1 mL saline solution intramuscular Control group (n=12),. Transrectal ultrasonography and blood collection were performed on days 4, 7, 8, 10, 13, 17, and 21 (D0 = start of estrus). On D21, the hCG-IU group showed a higher count ( $P<0.05$ ) of corpora lutea (CL) compared to the control group. Accessory corpora lutea (CLa) were detected in the hCG-IU and hCG-IM groups (2/8; 25.0% and 7/11; 63.6%, respectively) ( $P<0.05$ ). Total luteal area (TLA) increased in the hCG-IM group between D13 and D17 ( $P < 0.05$ ). Vascular area (AV) was higher ( $P<0.05$ ) in the hCG-IU group on D13. Mean hCG concentrations did not differ between groups ( $P>0.05$ ) on D7. In the hCG-IM group, mean hCG concentrations increased ( $P<0.05$ ) on D7.5 and remained so until D8. Serum P4 were similar ( $P>0.05$ ) among the three goat groups. Pregnancy rates on D30 were similar ( $P>0.05$ ) between the hCG-IM and control groups (91.0% or 10/11 and 83.0% or 10/12, respectively) and both were higher ( $P<0.05$ ) than hCG-IU (25.0% or 2/8). Administration of hCG intrauterine is not recommended.

**Keywords:** Goat, Corpus luteum, Human Chorionic Gonadotropin, Progesterone, Ovarian Ultrasonography.

## 1. Introduction

Brazil has a well-established tradition in the breeding of goats and sheep, which are essential activities for the economic and nutritional support of many families in rural areas, especially those with lower incomes (Sorrio, 2017). The Brazilian goat population is estimated at around 12 million heads, with 95.21% of these goats located in the Northeast region (IBGE, 2021). Conversely, the Southeast region represents only 1.24% of the national herd (IBGE, 2021) but is a reference in goat milk production. This prominence is attributed to the intensive production system and the genetic profile of animals specialized in milk production in this region (Lopes et al., 2012; Lôbo et al., 2017), where reproduction occurs seasonally (Balaro et al., 2019).

Reproductive seasonality necessitates the application of techniques for synchronized or non-synchronized estrus induction (Fonseca et al., 2011). However, the serum concentrations of progesterone (P4) in animals subjected to synchronized estrus induction during the non-reproductive season are lower than those found in cyclic females in sheep (Rhind et al., 1978; Theodosiadou et al., 2004) and goats (Błaszczuk et al., 2004). This prevents the creation of a suitable environment for the establishment and maintenance of pregnancy, directly affecting conceptus development (Lonergan et al., 2016; Forde and Lonergan, 2017).

Attempts to address this issue have been shown that the administration of human chorionic gonadotropin (hCG) by intramuscular injection increased pregnancy rates in goats subjected to naturally (Côrtes et al., 2021) and artificially inseminated synchronized estrus (Rodrigues et al., 2022). In both studies, the formation of accessory corpora lutea with a significant increase (Rodrigues et al., 2022) or without (Côrtes et al., 2021) an increase in plasma progesterone was observed. The possibility that this increase in

pregnancy rates is not necessarily limited to progesterone prompted the hypothesis that other mechanisms could contribute to this effect (Côrtes et al., 2021).

Typically, the preferred route for hCG administration is intramuscular, although intravaginal route has also been tested. The administration of hCG by intravaginal route at the time of artificial insemination (Day 2 after estrus onset) increased plasma progesterone concentration on Day 17 (Rodrigues et al., 2023a). This strategy also increased the pregnancy rate in cyclic goats subjected to estrus synchronization and artificial insemination (Rodrigues et al., 2023a). Another possibility would be the intrauterine administration of hCG along with the fluid that carries the embryo, something that could be performed during surgical embryo transfer (Fonseca et al., 2018) or non-surgical transfer (Morais et al., 2020). It is known that intrauterine hCG administration had significant effects on endometrial mucosa and endothelial adhesion molecules in women, this resulting clinical perspectives are that intrauterine administration of hCG might support aspects of endometrial vascularization (Bienert et al., 2021). However, there is no literature description of intrauterine hCG administration in ruminants. Thus, we hypothesized that intrauterine hCG administration may evoke luteal and serum effects similar to those observed with intramuscular administration, opening a new perspective for the administration of this gonadotropin in ruminants.

The aim of this study was to evaluate the efficiency of 300 IU of hCG administered by intramuscular or intrauterine routes at the seventh day of estrous cycle on luteal parameters and serum hCG and progesterone levels in acyclic dairy goats subjected to synchronous estrus induction.

## **2. Materials and methods**

### 2.1 Ethics, Location, and Experimental Animals

This study was conducted in accordance with the standards of the Ethics Committee of Embrapa Dairy Cattle (protocol 6789240322). The experiment took place at the Experimental Farm José Henrique Bruschi of Embrapa Dairy Cattle located in Coronel Pacheco, MG, Brazil (435 m altitude, 21°35'S latitude, and 43°15'W longitude), during the months of September and October of 2023.

Forty-four dairy goats [nulliparous (n = 27) and multiparous (n = 17)], over eight months old, clinically healthy, non-pregnant, non-lactating, with an average body weight (BW) of  $56.5 \pm 11.5$  kg, and a body condition score (BCS) of  $3.0 \pm 0.2$  on a scale of 1 to 5, according to Detweiler et al. (2008), were used. The goats were raised in an intensive system and fed with corn silage, supplemented with concentrate according to their nutritional needs (National Research Council, 2007), mineral salt, and water *ad libitum*.

### 2.2 Experimental design

For synchronous estrus induction (Fig.1), all goats received intravaginal sponges containing 60 mg of medroxyprogesterone acetate (MAP; Progespon, Zoetis, São Paulo, Brazil) inserted in the late afternoon (17:00 - 18:00 h) during six (6) days. Additionally, 200 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG; Foli-rec 7000; Zoovet, Santa Fé, Argentina), and 131.5 µg of cloprostenol (Sincrocio, Ouro Fino, Cravinhos, Brazil), were administered i.m. 24:00 h before sponge removal. The estrus was checked twice daily to determine the onset and duration (hours) of estrus by assessing the female's receptivity to the male; starting 12:00 h after MAP device removal, with the use of a fertile male placed in pens with females for 30 minutes, and the onset of estrus manifestation considered as day 0 (D0) of the estrous cycle. Mating was performed using the preferred natural mating method according to Fonseca (2020), mating the goats at the beginning of estrus and

24:00 h later, not exceeding two coverings per goat, with intact males (male/female ratio of 1:6) previously subjected to breeding soundness evaluation.

Goats that responded to the estrus induction and synchronization protocol ( $n = 36$ ), were allocated equitably by body weight (BW), body condition score (BCS), parity, and time elapsed since intravaginal device removal to estrus (IRIE) into three groups: (I) goats that received 300 IU of intrauterine transcervical hCG (hCG-IU group;  $n = 12$ ; BW:  $56.1 \pm 9.6$  Kg, BCS:  $3.0 \pm 0.2$ , ERIE:  $40.0 \pm 18.0$  h, and parity order:  $1.3 \pm 0.5$ ); (II) goats that received 300 IU of intramuscular hCG (hCG-IM group;  $n = 12$ ; BW:  $57.0 \pm 9.4$  Kg, BCS:  $2.9 \pm 0.3$ , ERIE:  $40.4 \pm 15.4$  h, and parity order:  $1.5 \pm 0.5$ ), and (III) goats that received 1 mL intramuscular saline solution (control group;  $n = 12$ ; BW:  $56.6 \pm 9.6$  Kg, BCS:  $3.0 \pm 0.6$ , ERIE:  $40.0 \pm 16.4$  h, and parity order:  $1.4 \pm 0.5$ ) on the seventh day of the estrous cycle (D7).

In the hCG-IU and hCG-IM group, 5000 IU of hCG were initially diluted in 16.6 ml of saline solution, to a final concentration of 300 IU/0,2 ml of this solution.

For the transcervical intrauterine administration of hCG (hCG-IU group,  $n = 12$ ), an adaptation of embryo collection through the transcervical technique (Fonseca et al., 2013) was performed, using the semen applicator and sheath for artificial insemination (AI). Ten minutes before the procedure, goats received a 1% acepromazine solution (Acepran 1%, Vetnil/Univet, São Paulo, Brazil), at a rate of 1 mL per 100 Kg of body weight, intramuscularly. Additionally, 2 mL of 2% lidocaine hydrochloride (Lidovet, Bravet, Rio de Janeiro, Brazil) per animal was administered by epidural route in the sacrococcygeal region, and an additional 5 mL was used on the cervical mucosa for pain prevention. With a Collin speculum (sizes 0–3) and a flashlight, the cervical opening is positioned. Subsequently, the uterine body was immobilized using two 26 cm Pozzi forceps, which were cut 0.5 to 1 cm laterally to the cervical opening, and the semen

applicator was inserted into the cervical canal until it reached the uterine body, depositing the hCG ipsilaterally to the ovary with a greater number of Cls.

### *2.3 Transrectal Ultrasonography and Ovarian Dynamics*

Transrectal ultrasonography (B-mode and color Doppler) was performed in all experimental groups using a portable ultrasound device (M5 Vet; Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China) equipped with a 7.5 MHz linear rectal transducer adapted for use in small ruminants, protected by a sanitary chemise. Ovarian ultrasound exams were performed one week before estrus induction to ensure seasonal anestrus (absence of CL and of follicles in advanced stages of development) and on days 4, 7, 8, 10, 13, 17, and 21 for detection and measurement of luteal structures; video clips were recorded for later analysis. Original corpus luteum (oCL) were those observed up to D7, while accessory corpus luteum (aCL) were those observed after hCG administration. The animals were kept station during the entire examination. Feces were manually removed, and 10 mL of carboxymethyl cellulose gel (Clinical Gel; RMC Clinical Gel, Amparo - SP, Brazil) was deposited in the rectum using a 60 mL syringe, with approximately 5 mL applied to the transducer before each ultrasonographic examination.

All exams were performed by the same technician, and equipment settings were standardized and kept constant throughout the experimental period (frames per second [FPS]: 23, depth [D]: 6.7 cm, Gain [GN]: 255, CFM frequency: 6.0 MHz, pulse repetition frequency [PRF]: 1.0 KHz; wall filter [WF]: 75 kHz) (Cosentino et al., 2018).

All ovarian structures detected were outlined in individual ovarian graphs recording their diameter, position, echogenicity and vascularization. The diameter of all ovarian structures (follicles, oCLs and aCLs) was calculated by the average of two perpendicular measurements obtained from B-mode images. The antral follicular population was classified into four categories according to diameters: Class-1 ( $\leq 3$  mm);

Class-2 (3.1 – 4.0 mm); Class-3 (4.1 – 5.0 mm); and Class-4 (> 5.1 mm). Total luteal area (TLA) was determined by the sum of the cross-sectional areas of all visualized luteal structures; when present, central cavity areas were subtracted from the total luteal area (Côrtes et al., 2021).

The TIFF images of each ovary obtained by Doppler mode were imported into Fiji software (ImageJ 1.49a, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) for the determination of vascular area (VA) of each original corpus luteum (oCL) and accessory corpus luteum (aCL), according to Counce et al (2019). The length of the scale bar embedded in the ultrasound machine was used to define the scale (pixels per cm) in Fiji software (straight line selection tool, Analyze menu [Set Scale...]). The imported images were cropped on the X and Y axes (rectangle selection tool [Image menu -> Crop]) to remove animal identification, and the files were renamed to anonymize the datasets for further analysis.

The luteal tissue area was determined by drawing an edge representing the outer margin of the corpus luteum. After removing the outer region (Edit menu -> Clear Outside) from the region of interest (making the white region solid), the color threshold feature (Image menu -> Adjust -> Color Threshold...) available within Fiji (Saturation: 65 and Brightness reduced to 40) was used to select and determine the area (Analyze menu -> Measure) of vascular flow (colored area) of the corpus luteum. The vascular area (VA) of the luteal region was calculated as the ratio of the colored area to the total luteal area (TLA). The final number of colored pixels was converted to mm<sup>2</sup>.

The diagnosis of pregnancy was performed 30 days after mating and confirmed 60 days after mating by means of uterine mode-B ultrasound, confirming the presence of the embryonic vesicle and fetal heartbeats.

#### *2.4 Blood Collection and Progesterone and hCG measurement*

Blood samples were collected from all goats through jugular vein puncture into vacutainer tubes containing clot activator to blood serum on each day of the ultrasonographic examination between 06:00 and 07:00 h (pre-prandial) and also after 12:00 h of hCG administration. After collection, the tubes were immediately placed in an icebox, transported to the laboratory, and centrifuged in a refrigerated centrifuge for 10 min at 1,500 x g. After centrifugation, the blood serum was aspirated and aliquoted in triplicate and stored in 1.5 mL microtubes at -20° C until progesterone and hCG assay, which was performed by solid-phase radioimmunoassay (RIA) using commercial kits according to the methodology proposed by the manufacturer (ImmuChem, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA and hCG Irma Kit, Immunotech, Prague, Czech Republic), following the manufacturer's instructions. The sensitivity were 0.05 ng/mL and 0.96 IU/L, and the intra-assay coefficient of variation were 8% and 7%, respectively for progesterone and hCG. All data were found to be within the minimum and maximum points of the curve.

#### *2.5 Statistical analysis*

The following data were recorded: estrus response (%); interval to estrus (h); pregnancy rate (%); serum hCG concentration (ng/mL); serum P4 concentration (ng/mL); number of oCL (n); number of aCL (n); luteal area (mm<sup>2</sup>); Vascular area (mm<sup>2</sup>).

Statistical analysis was performed using the software BioEstat 5.3 (Belém, Brazil) and IBM SPSS Statistics software, version 19. The general linear model with repeated measures over time was applied to the data collected between days. Shapiro Wilk and Levene tests were used to verify the normality and homogeneity of variances, respectively. Log-transformation performed to address skewed data. Non-parametric data

were analyzed by the Mann-Whitney test and the Kruskal Wallis followed by Dunn's post hoc; for parametric data, t-test and ANOVA followed by Tukey's post hoc was applied. Frequencies were assessed by Chi-square or Fisher's exact test. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

### 3. Results

Thirty-six goats used in the study exhibited estrus (36/44; 81,8%), and there was no difference in the estrus interval between the groups ( $P > 0.05$ ). Thirty-five goats (97.2%) that showed estrus had at least one detectable corpus luteum (CL) by ultrasound on D7 (hCG-IU: n=12, hCG-IM: n=11, and control: n=12). Four nulliparous goats from hCG-IU group were excluded from the study because cervical transposition was not possible.

The values of antral follicular population present in the ovaries on D7 after estrus are reported in Table 1. On D7, the percentage of goats with Class 1, Class 2, and Class 3 follicles did not differ ( $P > 0.05$ ) between the groups in this study. The number of Class-4 follicles was higher ( $P < 0.05$ ) in the hCG-IU group compared to the control, but did not differ ( $P > 0.05$ ) from the hCG-IM group.

The mean count of CL on D7 was similar ( $P > 0.05$ ) among the three groups, while on D21, it was higher ( $P < 0.05$ ) in hCG-IM group compared to control but did not differ from hCG-IU group (Fig. 2). Accessory corpora lutea (aCL) were detected in two animals from hCG-IU group (2/8; 25.0%) and seven from hCG-IM group (7/11; 63.6%), and none were located in control animals between D7 and D21. In hCG-IU group, one aCL was visualized in one goat on D8 and another goat on D10. In hCG-IM group, six goats had aCL on D13, and one on D17. Each of the two treated goats in hCG-IU group developed

1 aCL each. In hCG-IM group, two animals had two aCLs, and the other four goats formed only one aCL each. Thus, the final number of all luteal structures (ovulatory CL + aCLs) on D21 was higher ( $P < 0.05$ ) than on D7 in hCG-IU and hCG-IM group ( $2.6 \pm 0.4$  and  $3.3 \pm 0.3$ , respectively), compared to control ( $1.6 \pm 0.4$ ).

The total luteal area (TLA) did not differ ( $P > 0.05$ ) among the groups from D4 to D13; however, it was observed that on D13 and D17, there was an increase ( $p < 0.05$ ) in the hCG-IM group compared to the control. A decrease in TLA was observed in control from D17 to D21, which was different ( $P < 0.05$ ) from hCG-IM group. Already hCG-IU group did not differ ( $P > 0.05$ ) from hCG-IM group and control between D17 to D21 (Fig. 3).

Vascular area (VA) did not differ ( $P > 0.05$ ) among the groups from D4 to D10. On D13, VA was higher ( $P < 0.05$ ) in hCG-IU group compared to control; however, there was no difference ( $P > 0.05$ ) between hCG-IU and hCG-IM group. There was a decrease in VA in groups hCG-IU and control from D13 to D17, leading to a difference ( $P < 0.05$ ) between these two groups and hCG-IM group (Fig. 4).

In all studied animal groups, mean circulating hCG concentrations did not differ ( $P > 0.05$ ) on D7. In hCG-IM group, mean hCG concentrations increased ( $P < 0.05$ ) on D7.5 and remained so until D8. From D8 to D10, there was a decrease in hCG concentrations in hCG-IM group, and from then on, there was no difference ( $P > 0.05$ ) between the groups (Fig. 5).

There were no differences ( $P > 0.05$ ) in mean circulating P4 concentrations among the three goat groups throughout the study period. A peak in P4 in hCG-IM group occurred on D13, but it was not sufficient to generate a significant difference nor trend (Fig. 6).

Pregnancy rates at D30 were similar ( $P > 0.05$ ) between hCG-IM (91.0% or 10/11) and Control (83.0% or 10/12) groups and both groups had superior ( $P < 0.05$ ) pregnancy rates when compared to hCG-IU (25.0% or 2/8). The same pattern was confirmed in examinations performed on D60.

#### **4. Discussion**

This study presents, for the first time, results related to the administration of hCG on the seventh day of the estrous cycle through the intrauterine route in goats induced into estrus. Previous studies have demonstrated that hCG administered on the seventh day could promote the formation of accessory CL (corpus luteum) in goats when applied by intramuscular (i.m) (Rodrigues et al., 2023b; Rodrigues et al., 2023a; Rodrigues et al., 2022; Côrtes et al., 2021) and intravaginal routes (Rodrigues et al., 2023a). In the current study, hCG administered by the intrauterine route induced CL in two females (25.0%), accompanied by an increase in luteal vascularization on D13.

The reduction in the number of CLs on D21, observed only in the control group, resulted from luteolysis in non-pregnant goats of this group (Balara et al., 2017). The pregnancy rate in the hCG-IU group was lower than in the control group (25.0% vs. 83.0%, respectively). However, in the hCG-IU group, there was a better maintenance of luteal vascularization on D21. This increase in vascularization may be attributed to the angiogenic action of hCG (Sugino et al., 2000; Wulff et al., 2000), as reported by Rodrigues et al. (2022), where hCG administered intramuscularly on the seventh day of the estrous cycle in acyclic goats elevated luteal vascularization between D13 and D17 of the estrous cycle.

The detection of aCL in the hCG-IM group mainly occurred on D13 (85.7%), similar to previous findings in goats (Côrtes et al., 2021; Rodrigues et al., 2022; Rodrigues et al., 2023b) and sheep (Fonseca et al., 2018; Vergani et al., 2020), due to the average time required for the action of hCG on the luteinization/ovulation of antral follicles responsive to LH (108 h; Alvarado-Espino et al., 2016). In the hCG-IU group, one goat presented aCL on D8, and another on D10. The early appearance of luteal structures may have been caused by the faster action of hCG on the ovaries when administered by the intrauterine route, based on the countercurrent mechanism between the utero-ovarian vein and the ovarian artery, similar to what happens with PGF2 $\alpha$  (Ginther, 1967).

Despite the significant effects of hCG administered by the intrauterine route on CL function, no differences were observed in the mean concentrations of P4 among groups throughout the study, similar to the findings of Côrtes et al. (2021) using the same hCG dose administered intramuscularly. The authors suggested an action of hCG in reducing the number of "proluteolytic" estrogenic follicles, increasing the production of luteal factors beyond P4, including embryotrophic factors and facilitators of placentation, such as insulin-like growth factors. This action can occur both directly in the uterine endometrium and in embryo viability. It is important to note that hCG has receptors (LHR) in various extragonadal reproductive tissues, such as the oviduct, endometrium, intact uterus, myometrium, uterine vessels, and cervix, as reviewed by Fields and Shemesh (2004). This suggests that the benefits of hCG may extend beyond luteotropic action, as proposed by Côrtes et al. (2021).

A notable initial finding in the present study concerns the P4 levels immediately prior to hCG administration in all groups. As shown in Fig. 6, P4 levels were five times higher (10 ng/mL) than those reported (2 ng/mL) in a comparable study (Rodrigues et al., 2022). This discrepancy may have compromised the ability to observe the full effect of

hCG on this parameter or may indicate increased P4 synthesis activity by the corpus luteum (CL) in response to hCG stimulation. This discrepancy may be explained by the fact that our study represents the first attempt to analyze P4 levels following synchronized estrus induction in acyclic goats using r-eCG. Whether this modified form of eCG can induce greater CL activity remains a subject for future investigation, particularly in comparison to the natural eCG molecule. If confirmed, this finding could advocate for the use of r-eCG over native eCG, considering ethical considerations (Vilanova et al., 2019), naturally.

The serum hCG recorded by radioimmunoassay for the first time in goats revealed two important features. The first one was expected; the intramuscular route showed a significant and sustained increase in hCG levels over the measured days, as indicated earlier using the rapid  $\beta$ -hCG human test (Rodrigues et al., 2023a). Thus, the rapid  $\beta$ -hCG test could be an interesting option for investigating hCG levels in the blood of goats. However, using the rapid  $\beta$ -hCG test, no goats in the control group were reported as being positive for hCG (Rodrigues et al., 2023a). The second interesting finding was associated with the fact that control goats tested positive for hCG. It raises a doubt if it could be associated with cross-reaction of hCG antibodies from RIA test with LH, r-eCG or another non-identified molecule associated with early pregnancy in goats.

Finally, it is important to highlight that the hypothesis proposed in the present study was partially confirmed by the potential beneficial effects of hCG administered by the intrauterine route as supported by vascular luteal perfusion measured by Doppler. Although there is another window of study including endometrial and endothelial known effects by which hCG can potentially provide a uterine environment more suitable for pregnancy establishment (Bienert et al., 2021), considering the conditions of the present

study, where no additional and desired effects of using hCG by this route were observed, this route is not encouraged.

## **5. Conclusion**

This study explored the effects of human chorionic gonadotropin (hCG) administration different routes in goats, finding that while all routes induced estrus and influenced corpus luteum (CL) formation, the intrauterine route uniquely accelerated CL formation and increased luteal vascularization on D13. However, these distinct outcomes did not lead to improved pregnancy rates when compared to other administration routes.

**Conflict of interest**

All authors declare that they do not have any actual or potential conflict of interest including any financial, personal, or other relationships with other people or organizations.

**Acknowledgements**

This study was supported by the CNPq (314952/2018-7), EMBRAPA (20.19.01.004.00.03.001) and FAPEMIG (CVZ-PPM-000201-17 and BPQ 0308-22). The authors also thank the Multiuser Laboratory of Bioefficiency and Sustainability (LMBS Embrapa Dairy Cattle) for providing animals, facilities, and essential staff for the accomplishment of this study. ALM, LRC and PSCR were supported by Capes, ALRSM are fellows of FAPERJ. Moreover, FZB and JFF are CNPq fellows.

**Credit authorship contribution statement**

**A.L. Martins:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing

**L.R. Côrtes:** Methodology, Investigation

**J.N.D. Rodrigues:** Methodology, Writing - review & editing

**P.S.C. Rangel:** Statistical analyses.

**B. Waddington:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing

**A. L. R. S. Maia:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing

**L. G. B. Siqueira:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing

**F.Z. Brandão:** Methodology, Investigation.

**J.F. Fonseca:** Conceptualization, Methodology, Resources, Investigation, Writing - review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition

## References

- Alvarado-Espino, A.S., Meza-Herrera, C.A., Carrillo, E., González-Álvarez, V.H., Guillen-Muñoz, J.M., Ángel-García, O., Mellado, M., Véliz-Deras, F.G, 2016. Reproductive outcomes of Alpine goats primed with progesterone and treated with human chorionic gonadotropin during the anestrus-to-estrus transition season. *Animal Reproduction Science*. 167, 133–8. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.019>
- Balaro, M.F.A., Santos, A.S., Moura, L.F.M, Fonseca, J.F., Brandão, F.Z., 2017. Color Doppler ultrasound, does, luteinized-persistent follicle, number of colored pixels, progesterone. *Theriogenology*, 95, 118-126. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.02.021>
- Balaro, M.F.A., DE Mello, S.G.V., Da Silva Santos, A., Cavalcanti, L.M., Almosny, N.R.P., Fonseca, J.F., Brandão, F.Z., 2019. Reproductive seasonality in Saanen goats kept under tropical conditions. *Tropical Animal Health and Production*. 51(2), 345-353. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1696-2>
- Blaszczyk, B., Udala, J.; Gączarzewicz, D. Changes in estradiol, progesterone, melatonin, prolactin and thyroxine concentrations in blood plasma of goats following induced estrus in and outside the natural breeding season. *Small Ruminant Research*, v. 51, p. 209–219, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00190-1](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00190-1)
- Bienert, M., Habib, P., Buck, V., Classen-Linke, I., Skoblo, R., Rösing, B., 2021. Intrauterine hCG application increases expression of endothelial cell–cell adhesion molecules in human. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 304, 1587–1597. <https://doi.org/10.1007/s00404-021-06031-9>
- Bulletti, C., Ziegler, D., Giacomucci, E., Polli, V., Rossi, S., Alfieri, S., Flamigni, C., 1997. Vaginal Drug Delivery: The First Uterine Pass Effect. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 828(1), 285–290. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb48549.x>
- Counce, S.L., Dadarwal, D., Adams, G.P., Brar,P., Singh, J., 2019. An objective volumetric method for assessment of ovarian follicular and luteal vascular flow using colour Doppler ultrasonography. *Theriogenology*. 138, 66-76. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.039>

Côrtes, L.R., Souza-Fabjan, J.M.G., Dias, D.S., Martins, B.B., Maia, A.L.R.S., Veiga, M.O., Arashiro, E.K.N., Brandão, F.Z., Oliveira, M.E.F., Bartlewski, P.M., Fonseca, J.F., 2021. Administration of a single dose of 300 IU of human chorionic gonadotropin seven days after the onset of estrus improves pregnancy rate in dairy goats by an unknown mechanism. *Domestic Animal Endocrinology*. 66(1), 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106579>

Detweiler, G., Gipson, T., Merkel, R., Goetsch, A., Sahl, T., 2008. Body condition scores in goats. *Annual Goat Field Day*, 23. Langston: Langston University. 127–33.

Fonseca, J.F., Cruz, R.C., Pinto, P.H.N., Facó, O. Manual de sincronização e indução do estro e ovulação em ovinos e caprinos. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos. Documentos, 103, 59, 2011. (Acesso: janeiro de 2024). <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/58165/1/DOC-103.pdf>

Fonseca, J.F., Zambrini, F.N., Alvim, G.P., Peixoto, M.G.C.D., Verneque, R.S., Viana, J.H.M., 2013. Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical technique. *Small Ruminants Research*, 111, 96-99. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.08.007>

Fonseca, J.F., Castro, A.C.R., Arashiro, E.K.N., Oliveira, M.E.F., Zambrini, F.N., Esteves, L.V., Brandão, F.Z., & Souza-Fabjan, J.M.G., 2018. Effects of hCG administration on accessory corpus luteum formation and progesterone production in estrous-induced nulliparous Santa Inês ewes. *Animal Reproduction*, 15(2), 135–139. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2017-957>

Fonseca, J.F., 2020. Inseminação Artificial Transcervical em Tempo Flexível (IATFx) em cabras leiteiras. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos. 13 p. il. color. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Circular Técnica, 49). Link: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/221325/1/CNPC-2020-Art.53.pdf>

Forde, N., Lonergan, P., 2017. Interferon-tau and fertility in ruminants. *Reproduction*. 154, 5, 33-43. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0432>

Ginther, O.J., 1967. Local utero-ovarian relationships. *University of Wisconsin, Madison, Journal of Animal Science*. 26, 578–585.

Hussain, A., Ahsan, F., 2005. The vagina as a route for systemic drug delivery. *Journal*

of Controlled Release. 103(2), 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.034>

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal - Tabela 3939: Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho. 2021. (Acesso em: 08 de fevereiro de 2023). <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>

Lonergan, P., Forde, N., Thomas Spencer, T., 2016. Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(2), 66-74. <https://doi.org/10.1071/RD15326>

Lôbo, A.M.B.O., Lôbo, R.N.B., Facó, O., Souza, V., Alves, A.A.C., Costa, A.C., Albuquerque, M.A.M., 2017. Characterization of milk production and composition of four exotic goat breeds in Brazil. *Small Ruminant Research*. 153, 9-16. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.smallrumres.2017.05.005>

Lopes, F.B., DA Silva, M.C., Miyagi, E.S., Fioravanti, M.C.S., Facó, O., Guimarães, R.F., DE C. Júnior, O.A., Mcmanus, C.M., 2012. Spatialization of climate, physical and socioeconomic factors that affect the dairy goat production in Brazil and their impact on animal breeding decisions. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32, 1073–1081. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012001100001>

Morais, M.C.C., Esteves, L.V., Souza-Fabjan, J.M.G., Oliveira, M.E.F., Silva, M.R., Brandão, F.Z., Fonseca, J.F., 2020. Factors affecting pregnancy rates for goat embryos recovered and transferred by transcervical route. *Small Ruminant Research*. 192. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106215>

National Research Council-NRC. Nutrient requirements of Small Ruminants. Washington, DC: [s.n.]. <https://doi.org/10.17226/11654>

Rhind, S.M., Chesworth, J.M., Robinson, J.J., 1978. A seasonal difference in ovine peripheral plasma prolactin and progesterone concentrations in early pregnancy and in the relationship between the two hormones. *Journal of Reproduction and Fertility*. 52, 79-81. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0520079>

Rodrigues, J.N.D., Guimarães, J.D., Rangel, P.S.C., Oliveira, M.E.F., Brandão, F.Z., Bartlewski, P.M., Fonseca, J.F., 2023b. Ovarian function and pregnancy rates in dairy goats that received 300 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) intravaginally at the

time of artificial insemination. *Small Ruminant Research*, 227, 107061. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2023.107061>

Rodrigues, J.N.D., Guimarães, J.D., Rangel, P.S.C., Oliveira, M.E.F., Brandão, F.Z., Bartlewski, P.M., Fonseca, J.F., 2023a. Luteal function in cyclic goats treated with human chorionic gonadotropin administered by intramuscular or intravaginal routes at the time of artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*. 00, 1–9. <https://doi.org/10.1111/rda.14298>

Rodrigues, J.N.D., Guimarães, J.D., Oliveira, M.E.F., Dias, J.H., Arrais, A.M., Sousa, M.A.P., Bastos, R., Ahmadif, B., Bartlewskif, 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. *Reproductive Biology*. 22(1), 100591. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2021.100591>

Sorio, A., 2017. Diagnóstico da oferta e demanda de ovinos e caprinos para processamento de carne, pele e leite na região central do Tocantins. Tocantins: Triunfal.

SUGINO, N., Kashida, S., Takiguchi, S., Karube, A., Kato, H., 2000. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(10), 3919–3924. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.10.6888>

Theodosiadou, E., Goulas, P., Kouskoura, T.H., Smokovitis, A., 2004. Oestrogen and progesterone concentrations in plasma and oviductal tissue of ewes exhibiting a natural or induced oestrus. *Animal Reproduction Science*. 80, 59-67. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(02\)00223-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(02)00223-3)

Vergani, G.B., Fonseca, J.F., Trevizan, J.T., Pereira, V.S.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. *Animal Reproduction Science*. 223, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106644>

Wulff, C., Wilson, H., Largue, P., Duncan, W.C., Armstrong, D.G., Fraser, H.M., 2000. Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. *The Journal of*

clinical endocrinology and metabolism, 85(11), 4302–4309.

<https://doi.org/10.1210/jcem.85.11.6942>

**Table 1.** Reproductive parameters (% or mean  $\pm$  SEM) of acyclic dairy goats subjected to synchronous estrus induction protocol and receiving 300 IU of hCG by transcervical intrauterine (IU) or intramuscular (IM) or saline IM (Control) at Day 7 estrous cycle (Day 0= day of estrous onset).

	hCG-IU	hCG-IM	Control
Goats forming aCL (%)	25.0 (2/8) <sup>b,c</sup>	63.6 <sup>a</sup> (7/11)	0.0 <sup>c</sup> (0/12)
Goats with follicles $\leq$ 3.0 mm (%)	100.0 (8/8)	100.0 (11/11)	100.0 (12/12)
Goats with follicles 3.1 a 4.0 mm (%)	100.0 (8/8)	91.0 (10/11)	100.0 (12/12)
Goats with follicles 4.1 a 5.0 mm (%)	63.0 (5/8)	73.0 (8/11)	75.0 (9/12)
Goats with follicles > 5.1 mm (%)	100.0 (8/8)	100.0 (11/11)	75.0 (9/12)
Class-1 follicles ( $\leq$ 3.0 mm)	16.0 $\pm$ 2.0	14.7 $\pm$ 1.5	19.2 $\pm$ 1.8
Class-2 follicles (3.1 a 4.0 mm)	3.5 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.5	4.3 $\pm$ 0.7
Class-3 follicles (4.1 a 5.0 mm)	1.2 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.4
Class-4 follicles (> 5.1 mm)	2.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.9 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>	0.9 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> Values with different superscripts differed (P < 0.05);

( ) Number of animals

### Figure captions

**Figure 1.** Experimental design of the study. Effects of intrauterine administration of hCG seven days after estrus on luteal and plasma parameters of dairy goats in physiological anestrus submitted to synchronous estrus induction. Goats received 300 IU hCG or 1 mL of saline. Females were allocated randomly to the three groups immediately after estrus detection. Jugular blood samples were drawn, and B-mode and color Doppler the goats received 300 IU hCG or 1 mL of saline on day 7. US: transrectal ovarian ultrasonography; MAP: medroxyprogesterone acetate (progestin)-soaked sponges.

**Figure 2.** Number of corpora lutea (CL; Mean and S.E.M) in of acyclic dairy goats subjected to synchronous estrus induction protocol and receiving 300 IU of hCG by transcervical intrauterine (IU) or intramuscular (IM) or saline IM (Control) at Day 7 estrous cycle (Day 0= day of estrous onset).

<sup>ab</sup> Means with different superscripts among treatments differed ( $P < 0.05$ ).

<sup>AB</sup> Means with different superscripts among days differed ( $P < 0.05$ ).

**Figure 3.** Luteal area ( $\text{mm}^2$ , Mean and S.E.M) in of acyclic dairy goats subjected to synchronous estrus induction protocol and receiving 300 IU of hCG by transcervical intrauterine (IU) or intramuscular (IM) or saline IM (Control) at Day 7 estrous cycle (Day 0= day of estrous onset).

<sup>ab</sup> Means with different superscripts among treatments differed ( $P < 0.05$ ).

<sup>ABCD</sup> Means with different superscripts among days differed ( $P < 0.05$ ).

**Figure 4.** Doppler area (mm<sup>2</sup>, Mean and S.E.M) in in of acyclic dairy goats subjected to synchronous estrus induction protocol and receiving 300 IU of hCG by transcervical intrauterine (IU) or intramuscular (IM) or saline IM (Control) at Day 7 estrous cycle (Day 0= day of estrous onset).

<sup>ab</sup> Means with different superscripts among treatments differed (P < 0.05).

<sup>ABCD</sup> Means with different superscripts among days differed (P < 0.05).

**Figure 5.** Serum hCG concentration (ng/mL, Mean and S.E.M) in of acyclic dairy goats subjected to synchronous estrus induction protocol and receiving 300 IU of hCG by transcervical intrauterine (IU) or intramuscular (IM) or saline IM (Control) at Day 7 estrous cycle (Day 0= day of estrous onset).

\* Denotes difference among treatments (P < 0.05).

**Figure 6.** Serum P4 concentration (ng/mL, Mean and S.E.M) in in of acyclic dairy goats subjected to synchronous estrus induction protocol and receiving 300 IU of hCG by transcervical intrauterine (IU) or intramuscular (IM) or saline IM (Control) at Day 7 estrous cycle (Day 0= day of estrous onset).

Figure 1

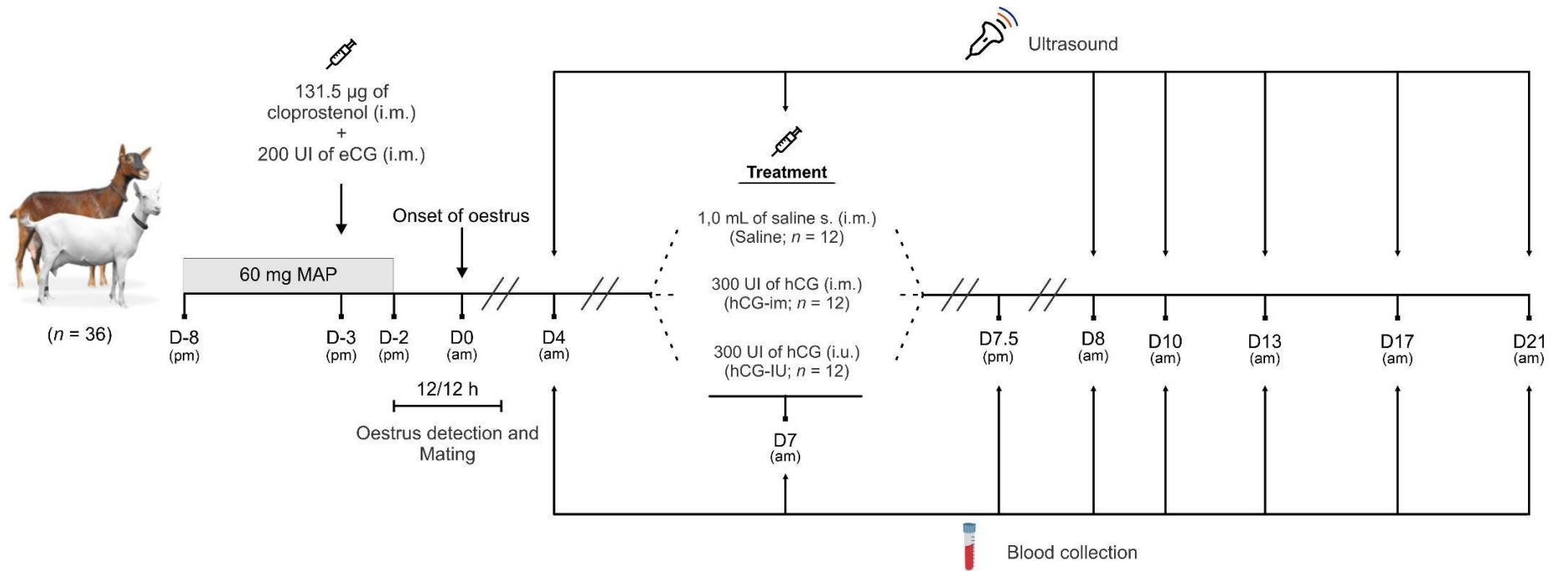


Figure 2

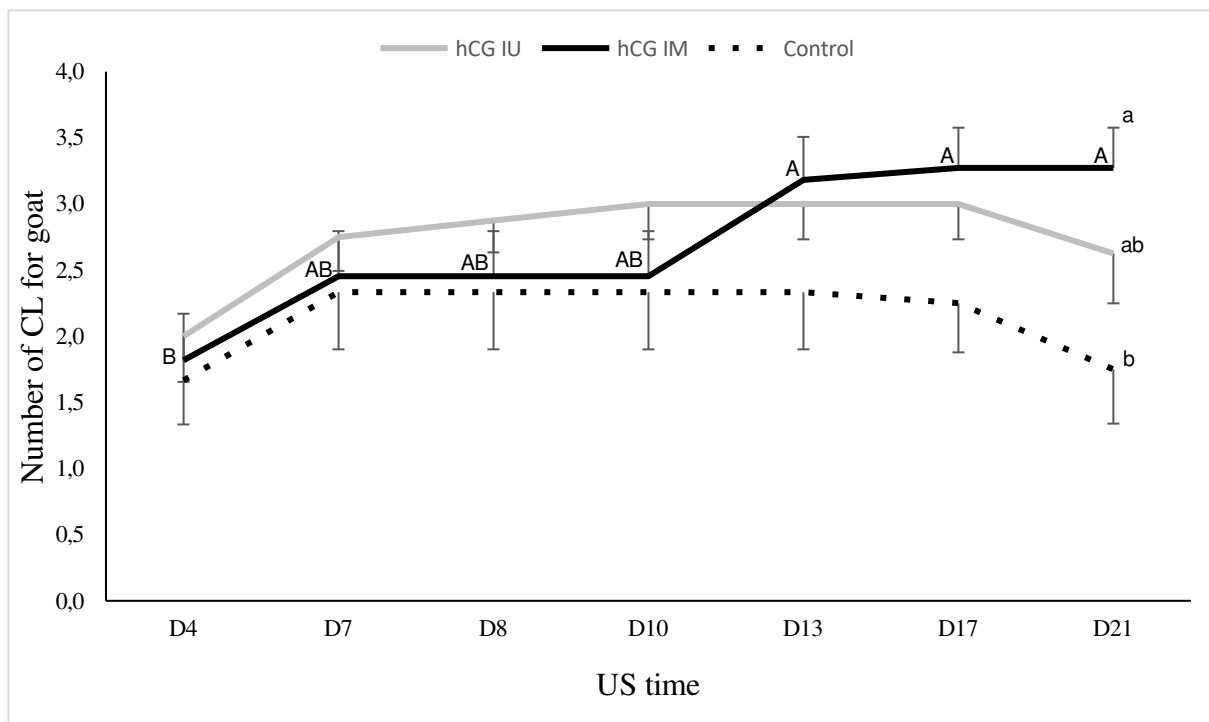


Figure 3

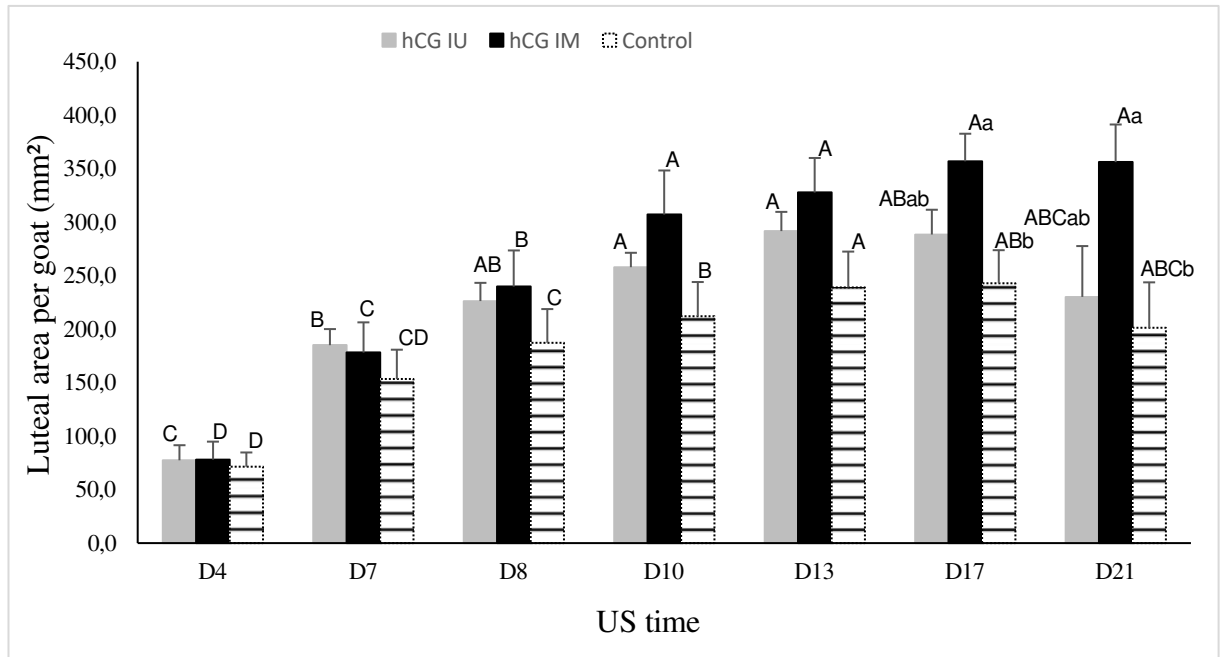


Figure 4

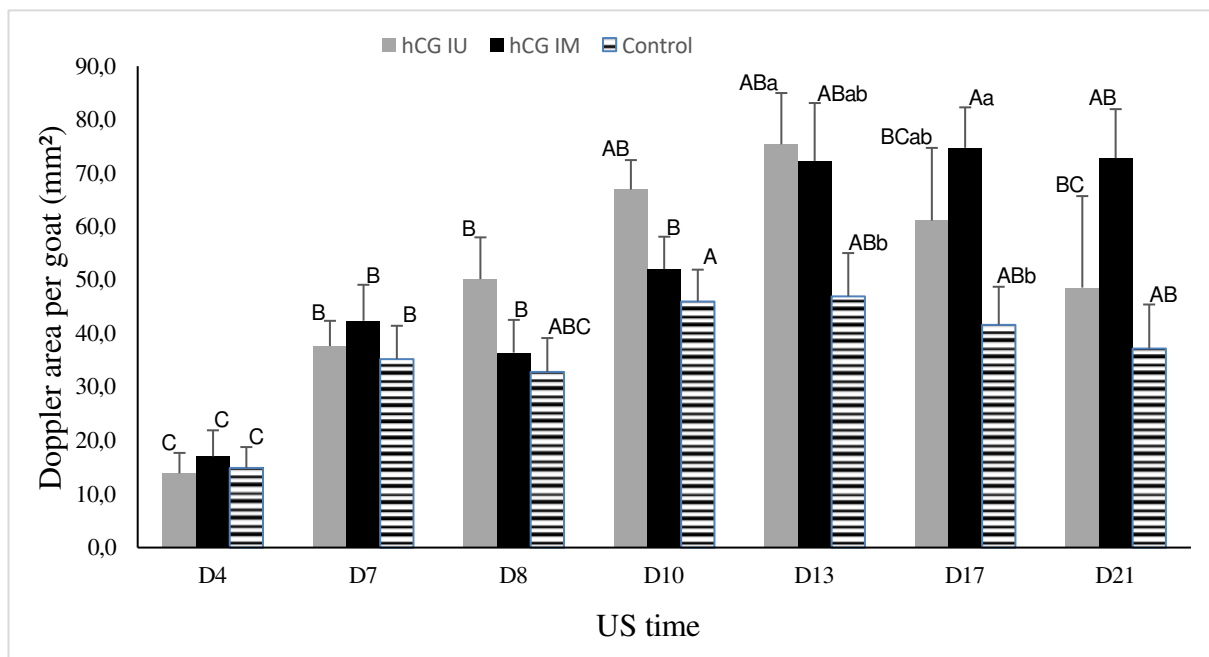


Figure 5

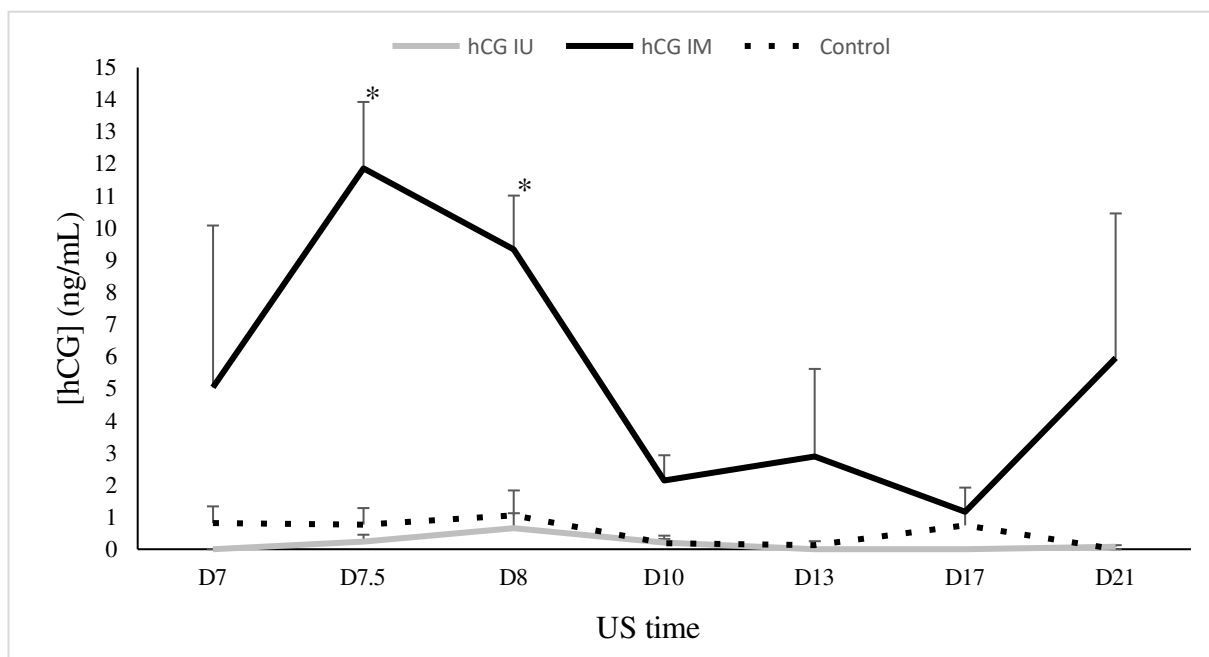
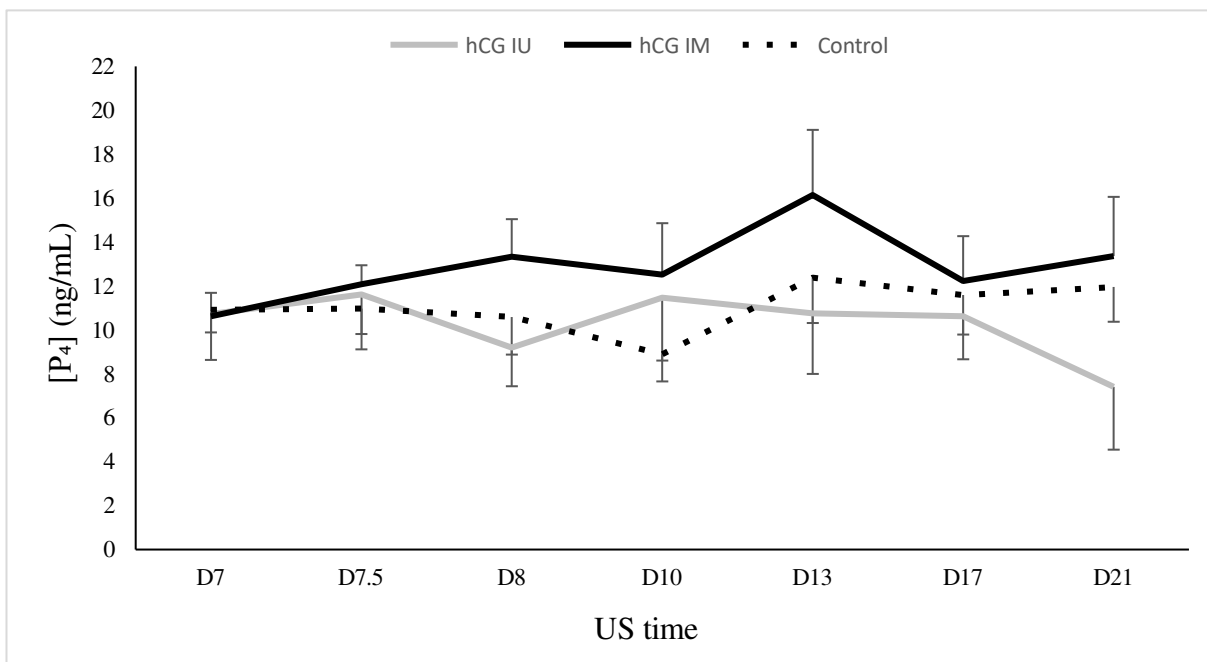


Figure 6



## 7. Anexo



Embrapa Gado de Leite  
Comissão de Ética no  
Uso de Animais

**CERTIFICADO : EMENDA** v08/03/2023

Certificamos que a EMENDA (versão de 08/03/2023) da proposta intitulada "Estratégias para aumentar a produção e taxa de gestação em cabras leiteiras doadoras e receptoras de embriões", CEUA nº 6789240322 (ID 047076), sob a responsabilidade de **Jeferson Ferreira da Fonseca** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (CEUA/EGL) em 12/07/2023.

Término previsto: 12/2022

Origem: Campo Experimental José Henrique Bruschi

Espécie: Caprinos	sexo: Machos	idade: 2 a 6 anos	Quantidade mantida: 10
Linhagem: Mestiços		Peso: 50 a 80 kg	

Origem: Campo Experimental José Henrique Bruschi

Espécie: Caprinos	sexo: Fêmeas	idade: 2 a 6 anos	Quantidade mantida: 90
Linhagem: Mestiços		Peso: 40 a 70 kg	

**ANIMAIS UTILIZADOS**

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Caprinos	Fêmeas	180	0
Caprinos	Machos	20	0

Juiz de Fora, 12 de julho de 2023



Dr. Rui da Silva Verneque  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Embrapa Gado de Leite

Maria Izabel Carneiro Ferreira  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Embrapa Gado de Leite

