

## **EFEITO DA eCG SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONAIS DO CORPO LÚTEO DE VACAS MESTIÇAS DURANTE A SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO**

*(Effect of the eCG on the morofunctional characteristics of the luteal body of mescuic cows during the synchronization of ovulation)*

Priscila Assis Ferraz<sup>1</sup>, Elisiane Satelles Santos<sup>1</sup>, Luiz Di Paolo Maggitti Junior<sup>1</sup>, Lindomar Sousa Brito<sup>1</sup>, João Vitor Gomes da Silva Carvalho<sup>1</sup>, Marcos Chalhoub Coelho Lima<sup>1</sup>, Antonio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Bahia

Corresponding author: prisferraz@gmail.com

**RESUMO:** Objetivou-se neste estudo avaliar o efeito do tratamento com gonadotrofina coriônica equina (eCG) sobre as características morofuncionais do corpo lúteo (CL) em vacas mestiças com diferentes concentrações circulantes de progesterona (P4) durante a sincronização da ovulação. Foram utilizadas 30 fêmeas mestiças submetidas a um protocolo de sincronização para IATF e divididas para receberem ou não de PGF2α no D0 no início do protocolo. No momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4, as vacas foram subdivididas aleatoriamente para receberem a aplicação ou não de eCG, de modo que 4 grupos de tratamento foram definidos (Grupo Alta P4- S/eCG, n=7; Grupo Alta P4-C/eCG, n=8; Grupo Baixa P4-S/eCG, n=7 e Grupo Baixa P4-C/eCG, n=8). Os quatro grupos experimentais foram analisados em um arranjo fatorial (2x2) com base em um delineamento inteiramente casualizado, sendo o primeiro fator a aplicação de PGF2α no dia zero (níveis 0 e 12,5 mg), enquanto o segundo fator foi a aplicação de eCG no dia oito do protocolo (níveis 0 e 300 UI). A análise estatística foi realizada utilizando-se o pacote estatístico *Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 19 (SPSS, 2012). Uma alta concentração de P4 no momento da sincronização da ovulação influenciou negativamente ( $P=0,03$ ) o diâmetro, volume e a vascularização do CL subsequente ao protocolo. Vacas tratadas com eCG e com alta concentração circulante de P4 no momento da sincronização da ovulação apresentaram diâmetro do CL ( $P>0,05$ ), semelhante às vacas com baixa concentração de P4. Conclui-se que elevadas concentrações circulantes de P4 impactaram negativamente nas características morofuncionais do CL e a administração de eCG pode ser utilizada como uma estratégia para favorecer uma melhor resposta luteal em fêmeas mestiças bovinas com alta concentração de P4 no momento da sincronização da ovulação.

**Palavras-chave:** Gonadotrofina; progesterona; doppler; fêmeas.

**ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the effect of treatment with equine chorionic gonadotrophin (eCG) on the morphofunctional characteristics of the corpus luteum (CL) in crossbred cows with different circulating concentrations of progesterone (P4) during ovulation synchronization. We used 30 crossbred females submitted to a synchronization protocol for IATF and divided to receive or not PGF2α. In the D0 at the beginning of the protocol and at the time of withdrawal of the intravaginal device of P4 were randomly subdivided for four groups to receive the application or not of eCG (High P4 Group P4-S / eCG, n = 7; High P4 Group P4-S / eCG, n=8; Low P4 Group S/eCG, n = 7, and Low P4 Group C/ eCG, n = 8). The

four experimental groups were analyzed in a factorial arrangement (2x2) based on a completely randomized design, the first factor being the application of PGF<sub>2α</sub> on day zero (levels 0 and 12.5 mg), while the second factor was the application of eCG at day eight of the protocol (levels 0 and 300 IU). Statistical analysis was performed using the statistical package Statistical Package for Social Science (SPSS), version 19 (SPSS, 2012). A high P<sub>4</sub> concentration at the time of ovulation synchronization negatively influenced ( $P=0.03$ ) the diameter, volume, and vascularization of CL subsequent to protocol. Cows treated with eCG and with a high circulating concentration of P<sub>4</sub> at the time of ovulation synchronization presented CL ( $P > 0.05$ ) diameter, similar to cows with low P<sub>4</sub> concentration. It is concluded that high circulating concentrations of P<sub>4</sub> negatively impacted the morphofunctional characteristics of CL and the administration of eCG can be used as a strategy to favor a better luteal response in bovine crossbred females with high P<sub>4</sub> concentration at the time of ovulation synchronization.

**Keywords:** Gonadotrophin; progesterone; doppler; females.

## INTRODUÇÃO

As biotécnicas da reprodução em bovinos têm avançado objetivando máxima eficiência reprodutiva e alto índice de produção (Bó et al., 2013). A Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) é uma biotecnologia reprodutiva com destaque crescente no agronegócio e proporciona maior rentabilidade e produção de animais geneticamente superiores (Baruselli et al., 2012).

Os tratamentos hormonais para IATF têm sido desenvolvidos para sincronizar a emergência de uma nova onda folicular; terminar a fase luteína de forma sincronizada e induzir a ovulação (Binelli et al., 2014). Altas concentrações circulantes de progesterona (P4) no momento da sincronização da ovulação podem comprometer a eficiência dos protocolos hormonais por diminuir a frequência dos pulsos de LH, afetando o crescimento folicular e a taxa de ovulação, bem como o desenvolvimento do corpo lúteo (CL) (Roberson et al., 1989).

A administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG) no momento da sincronização da ovulação no protocolo hormonal é uma estratégia que pode ser utilizada em animais que apresentam limitação na pulsatilidade de LH, devido a um ambiente hormonal com altas concentrações circulantes de P4 pré-ovulatórias (Dias et al., 2009; Peres et al., 2009). A eCG é um fármaco de meia vida longa, produzido nos cálices endometriais da égua prenhe que se liga aos receptores de FSH e LH dos folículos e aos receptores de LH do corpo lúteo em fêmeas bovinas (Murphy e Martinuk, 1991).

O impacto positivo do eCG nos protocolos de sincronização deve-se à capacidade deste fármaco em promover um aumento na capacidade esteroidogênica do CL e induzir alterações em níveis tecidual, celular e molecular que se relacionam com o

aumento da capacidade funcional e na síntese de P4 (Rigoglio et al., 2013). Após a ovulação, a presença de um corpo lúteo funcional que produza quantidades adequadas de P4 é essencial para o desenvolvimento embrionário, assim como para o estabelecimento e manutenção da gestação, possuindo papel fundamental no estabelecimento de um ambiente uterino propício para o desenvolvimento embrionário (Lonergan et al., 2013).

Até pouco tempo, a funcionalidade do CL era medida apenas pela dosagem sérica ou plasmática de P4 (Bicalho et al., 2008). Com o advento da ultrassonografia Doppler colorido, foi possível um melhor entendimento da fisiologia ovariana, assim como uma melhor avaliação da função vascular do CL, o que permite verificar se o fluxo sanguíneo está diretamente associado ou não com o potencial dessa estrutura em produzir P4 (Acosta et al., 2003). Um corpo lúteo com ausência de suprimento sanguíneo pode ser considerado como não funcional; ainda assim, a mesma estrutura pode ter tamanho normal (Matsui e Miyamoto, 2009). Adicionalmente a estes achados, Herzog et al. (2010) destacaram que o fluxo sanguíneo é mais apropriado do que o tamanho do CL para avaliação da sua funcionalidade, e que a concentração de P4 está positivamente correlacionada com o fluxo sanguíneo. Diante disso, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito do tratamento com eCG sobre características morfológicas e funcionais do CL de fêmeas mestiças com diferentes concentrações circulantes de P4 durante o protocolo de IATF.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado entre os meses de maio a agosto de 2016, na fazenda experimental de Entre Rios, pertencente à Escola de Medicina

Veterinária e Zootecnia da UFBA, localizada no município de Entre Rios, região Nordeste da Bahia, com latitude 11°56'31" sul, longitude 38°05'04" oeste e estando a uma altitude de 162 metros. A região apresenta pluviosidade média anual de 1.251,00mm e possui clima quente e semiúmido. A propriedade adotava um sistema extensivo de criação de animais mantidos em pastagens de *Brachiaria decumbens*, com suplementação mineral e acesso a água *ad libitum*. O projeto de pesquisa que deu origem a este artigo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da EMEVZ/UFBA, sob número 41/2016.

Para a realização desse estudo, foram utilizadas 30 vacas pluríparas, mestiças Holandês x Zebu. A média para escore de condição corporal (ECC) desses animais foi  $3,07 \pm 0,38$ , utilizando-se uma escala de 1 a 5 (Houghton et al., 1990). Estes animais encontravam-se em período pós-parto de  $77,34 \pm 22,13$  dias, apresentavam duração da lactação de  $279,67 \pm 58,67$  dias e produção média diária de leite de  $4,85 \pm 0,83$  Kg. Previamente ao início do experimento, os animais foram submetidos ao exame clínico-ginecológico e ultrassonografia transretal, utilizando-se um transdutor linear com frequência de 7,5 MHz (Mindray Z5, Shenzhen, China), sendo consideradas aptas a participar do experimento somente fêmeas que apresentavam no momento da avaliação ausência de anormalidade no trato reprodutivo.

As fêmeas foram submetidas ao protocolo de pré-sincronização para garantir que todos os animais apresentassem corpo lúteo (CL) no início do protocolo, sendo avaliadas por ultrassonografia (US) transretal para a verificação da presença de CL. Em dia aleatório do ciclo estral, denominado dia menos 16 (D -16), todos os animais receberam um dispositivo intravaginal de P4 (apenas dispositivos novos,

CIDR®, Zoetis, São Paulo, Brasil), contendo 1,9 g de P4 associado a 2,0 mg de Benzoato de Estradiol (BE; Gonadiol®, Zoetis, São Paulo, Brasil) por via intramuscular (i.m.). No dia menos 8 (D-8), foi removido o dispositivo de P4 e administrado 12,5 mg de Dinoprost Trometamina (PGF2α, Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m., seguido por 1mg de Cipionato de Estradiol (CE, ECP®, Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m. (Figura 1).

Oito dias após a retirada dos dispositivos de P4, no dia 0 (D 0), todos os animais foram avaliados por ultrassonografia transretal modo B, utilizando-se um transdutor linear com frequência de 7,5 MHz (Mindray Z5, Shenzhen, China) para verificar a presença de CL. Em seguida, as fêmeas foram submetidas a protocolo de sincronização e receberam um dispositivo intravaginal novo de P4 (CIDR®, Zoetis, São Paulo, Brasil), contendo 1,9 g de P4 associado a 2mg de BE (Gonadiol®, Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m. e, nesse mesmo dia, metade dos animais foram tratados com 12,5 mg de PGF2α (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m. No dia 8 (D8), foi removido o dispositivo e administrado 12,5 mg de PGF2α (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m., seguido por 1mg de CE (ECP®, Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m. em todos os animais, conforme Figura 1.

Nesse momento, as vacas que tinham sido ou não tratadas com PGF2α no início do protocolo de sincronização (Dia 0) foram aleatoriamente separadas para ser tratadas com 300UI de eCG (Folligon®, Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m. ou 1,5mL de solução salina à 0,9%. Desta forma, das 15 vacas não tratadas com PGF2α no Dia 0, sete foram tratadas com solução salina (Grupo Alta P4-S/eCG, n=7) e oito foram tratadas com eCG (Grupo Alta P4-C/eCG, n=8), enquanto que das 15 vacas tratadas com PGF2α no Dia 0, sete foram tratadas com solução salina (Grupo Baixa P4-S/eCG, n=7) e oito foram

tratadas com eCG (Grupo Baixa P4-C/eCG, n=8). Não foram verificadas perdas de dispositivo intravaginal de P4 neste experimento.

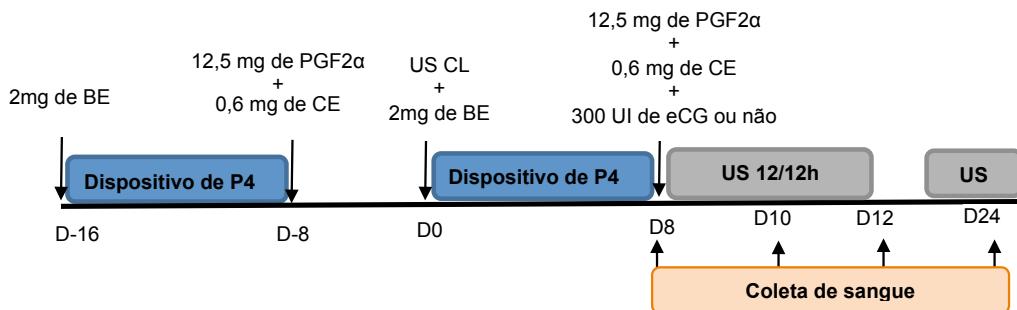
As avaliações do corpo lúteo do diestro subsequente foram realizadas pela ultrassonografia modo B e Doppler colorido (Mindray Z5, Shenzhen, China), no Dia 24 (D24) do protocolo de sincronização, ou seja, 12 dias após a última avaliação ultrassonográfica do fóliculo (Figura 1). Após a localização do ovário contendo o CL, o mesmo foi analisado por ultrassonografia em modo B e a imagem do CL foi congelada para mensuração do diâmetro (DCL), área total (ACL) e volume do CL (VCL). Nos CLs cavitários, foi calculada a área da cavidade luteal e subtraída da área total do CL. O volume da cavidade luteal foi subtraído do volume do corpo lúteo para se determinar o volume do tecido luteal em corpos lúteos cavitários, conforme metodologia descrita por Kastelic et al. (1990).

As imagens luteais foram armazenadas e calculou-se a área de vascularização do corpo lúteo (AVASCL) de cada animal, empregando uma função do próprio aparelho. Para determinação do percentual de vascularização da área do corpo lúteo (%PVASCL) foi realizada a razão entre a área de vascularização e área total do corpo lúteo, de acordo com metodologia proposta por Arêas (2012).

As amostras de sangue para dosagem da concentração plasmática de P4 foram coletadas nos dias D0, D8, D10, D24 do protocolo, conforme Figura 1, por meio da punção venosa cocígea em tubos a vácuo de 10mL, sem anticoagulante e imediatamente refrigerado em isopor contendo gelo, permanecendo a uma temperatura de 4°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3.000G por 15 minutos para separação do soro, transferidas para microtubos de polietileno, identificados e armazenados a -20°C até

o momento da análise. As análises da concentração de progesterona foram realizadas pela metodologia de quimioluminescência, utilizando o *imunoensaio Access immunoassay systems Progesterone*, no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da UFBA. O coeficiente de variação do interensaio foi de 2,6% e a sensibilidade do ensaio foi de 0,006ng/mL. O maior e menor coeficiente de variação interensaio foi de 6,4 e 0,7%, respectivamente.

Os quatro grupos experimentais foram analisados em um arranjo fatorial (2x2) com base em um delineamento inteiramente casualizado, sendo o primeiro fator a aplicação de PGF2α no dia zero (níveis 0 e 12,5 mg), enquanto o segundo fator foi a aplicação de eCG no dia oito do protocolo (níveis 0 e 300 UI). A análise estatística foi realizada utilizando-se o pacote estatístico *Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 19 (SPSS, 2012). Para tanto, se realizou a seguinte sequência de análises: 1- A média e desvio padrão das variáveis de interesse ao estudo foram obtidas por meio da análise descritiva; 2- As diferenças entre as variáveis de interesse: diâmetro do corpo lúteo (DCL), área do corpo lúteo (ACL) e volume do corpo lúteo (VCL), área de vascularização do corpo lúteo (AVASCL) e percentual da área de vascularização do corpo lúteo (%PVASCL), e a análise da concentração sérica de progesterona (P4DCL) nos diferentes grupos experimentais foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. Para todas as análises foram considerados nível de significância de 5%.



**Figura 1.** Representação esquemática dos protocolos de sincronização e *design* experimental. BE: Benzoato de estradiol. CE: Cipionato de estradiol. eCG: Gonadotrofina coriônica equina. P4: Progesterona. PGF2 $\alpha$ : Prostaglandina F2 alfa. US CL: Ultrassonografia transretal para detecção de CL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi verificado que no protocolo de sincronização duas vacas não ovularam, pertencentes aos seguintes grupos: Alta P4-S/eCG (1) e Baixa P4-S/eCG (1), portanto não apresentaram corpo lúteo, sendo assim excluídas desta análise estatística.

As fêmeas que apresentavam alta concentração circulante de P4 no momento da sincronização da ovulação e que não receberam eCG apresentaram menor diâmetro ( $P = 0,03$ ), volume ( $P = 0,01$ ) e área de

vascularização do CL no diestro subsequente ao protocolo ( $P = 0,02$ ) em comparação as vacas com baixa concentração de P4 que receberam ou não eCG, conforme Tabela 1. Os níveis circulantes de P4 pré-ovulatórios têm sido relatados como importante fator que interfere na eficiência dos protocolos de sincronização, no desenvolvimento do folículo dominante e consequentemente no diâmetro e função do CL no diestro subsequente, como pode ser observado na Figura 2.

**Tabela 1** - Médias e Desvios-padrão dos parâmetros morfológicos do corpo lúteo avaliados por modo B (mm e cm $^2$ ) e Doppler colorido (cm $^2$  e %) e as concentrações séricas de progesterona (ng/mL) no dia 24 do protocolo de sincronização nos diferentes grupos experimentais.

Variáveis	Grupos Experimentais					P-valor	Geral (n=28)
	Alta P4-S/eCG (n=6)	Alta P4 -C/eCG (n=8)	Baixa P4-S/eCG (n=6)	Baixa P4-C/eCG (n=8)			
DCL (mm)	17,66 ± 1,89a	19,28 ± 1,90ab	23,25 ± 4,46b	22,57 ± 4,13b	0,03	20,78 ± 3,91	
ACL (cm $^2$ )	2,54 ± 0,31	2,54 ± 0,70	3,68 ± 1,04	3,49 ± 1,29	0,09	3,07 ± 1,01	
VCL (cm $^3$ )	2,78 ± 0,91a	3,35 ± 1,16ab	5,22 ± 2,12b	5,94 ± 2,27b	0,01	4,38 ± 2,12	
AVASCL (cm $^2$ )	0,82 ± 0,29a	1,05 ± 0,37ab	1,21 ± 0,27b	1,54 ± 0,39b	0,02	1,14 ± 0,39	
%PVASCL (%)	26,20 ± 13,75	33,17 ± 14,02	42,00 ± 23,31	26,86 ± 5,90	0,32	31,18 ± 14,35	
P4D24 (ng/mL)	4,92 ± 3,34	9,30 ± 7,74	8,97 ± 2,24	13,01 ± 3,88	0,08	9,42 ± 5,53	

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si,  $P < 0,05$ . ANOVA, teste Tukey. Grupo Alta P4-S/eCG: não aplicação de PGF2 $\alpha$  no D0 e sem administração de eCG no dia 8 do protocolo de sincronização; Grupo Alta P4-C/eCG: não aplicação de PGF2 $\alpha$  no D0 e com administração de eCG no dia 8 do protocolo; Grupo Baixa P4-S/eCG: aplicação de PGF2 $\alpha$  no D0 e sem administração de eCG no dia 8 do protocolo de sincronização; Grupo Baixa P4-C/eCG: aplicação de PGF2 $\alpha$  no D0 e com administração de eCG no dia 8 do protocolo de sincronização; DCL: Diâmetro do corpo lúteo. ACL: Área do corpo lúteo. VCL: Volume do corpo lúteo. AVASCL: Área de vascularização do corpo lúteo. %PVASCL: Percentual de vascularização do corpo lúteo; P4D24: Concentração de progesterona do corpo lúteo.

Resultados semelhantes aos desta pesquisa foram encontrados por Pfeifer et al. (2009), os quais avaliaram o efeito da aplicação ou não PGF2 $\alpha$  em fêmeas de corte *Bos taurus taurus* no início do protocolo de sincronização e observaram que as vacas com baixa concentração de P4 no momento da sincronização da ovulação tiveram maior diâmetro ( $24,7 \pm 0,69$ mm) e a produção de P4 ( $4,0 \pm 0,3$ ng/mL) em comparação as fêmeas com alta concentração circulante de P4,  $22,2 \pm 0,76$ mm e  $3,1 \pm 0,2$ ng/mL, respectivamente. Carvalho et al. (2008), estudaram a dinâmica folicular em fêmeas *Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* e seus mestiços e verificaram diferença significativa nos animais com baixa concentração de P4 em comparação as fêmeas com alta concentração de P4 para o diâmetro do CL ( $18,3 \pm 0,6$  x  $16,4 \pm 0,8$ mm,  $P < 0,05$ ) no entanto, não observaram diferença na produção de P4 ( $4,5 \pm 0,4$  x  $4,6 \pm 1,0$  ng/mL,  $P = 0,70$ ) do CL no dia 22 do protocolo de sincronização da ovulação.

O desenvolvimento de um CL com condições de manter a prenhez depende de um folículo com adequado número de células da granulosa, da presença de receptores de LH nas células da teca e da granulosa do folículo e posterior capacidade de sintetizar adequadas quantidade de P4 depois da luteinização (Vasconcelos et al., 2013). De acordo com Luttgenau et al. (2011) baixas concentrações de P4 no momento da sincronização da ovulação favorecem o crescimento folicular e possivelmente folículos com maiores diâmetros desencadeiam a formação de um CL no diestro subsequente de maior tamanho e produção de P4. Uma adequada concentração de P4 durante o diestro é fundamental para o desenvolvimento embrionário, produção de interferon-tau

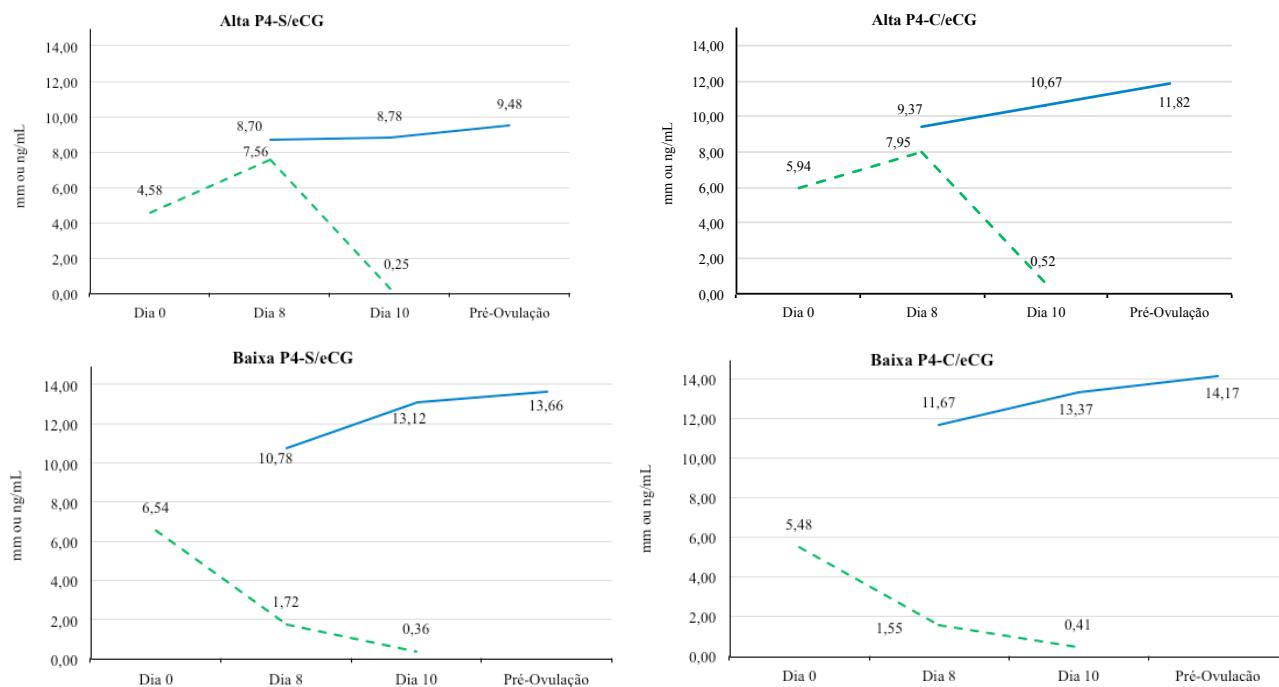
e estabelecimento e manutenção da prenhez em vacas (Mann e Lamming, 2001).

Em relação a administração da eCG e as características morofuncionais do CL subsequente ao protocolo de sincronização, os resultados deste estudo demonstraram que nas fêmeas com alta concentração circulante de P4 no momento da sincronização da ovulação e que receberam eCG, ocorreu o desenvolvimento de um corpo lúteo com diâmetro ( $19,28 \pm 1,90$ mm;  $P = 0,03$ ) semelhante em comparação as fêmeas com baixa concentração circulante de P4 e que receberam ou não eCG (Baixa P4-S/eCG:  $23,25 \pm 4,46$ mm e Baixa P4-C/eCG:  $22,57 \pm 4,13$ mm) no momento da sincronização da ovulação, conforme Tabela 1. Além disso, uma baixa concentração circulante de P4 no início do protocolo de sincronização associada ou não ao tratamento com eCG produziu um CL subsequente ao protocolo com maior volume (Baixa P4-S/eCG:  $5,22 \pm 2,12$  e Baixa P4-C/eCG:  $5,94 \pm 2,27$ cm $^2$ ;  $P = 0,01$ ), quando comparado ao volume luteínico dos animais que apresentavam alta concentração circulante de P4 e que não receberam eCG ( $3,35 \pm 1,16$ cm $^2$ ; Tabela 1).

Sá Filho et al. (2010) estudaram o efeito da eCG em novilhas Nelore com a presença ou ausência de CL no início do protocolo hormonal para IATF. Estes autores verificaram que as fêmeas que receberam eCG apresentaram maior diâmetro do CL (sem eCG:  $13,8 \pm 0,3$ mm e com eCG:  $15,5 \pm 0,3$ mm) no diestro subsequente e produção de P4 (sem eCG:  $3,6 \pm 0,7$  e com eCG:  $6,6 \pm 1,0$ mm) no 15 do protocolo de sincronização em comparação as que não receberam eCG. Além disso, os mesmos observaram que o diâmetro do CL no diestro subsequente e a concentração circulante de P4 no

diestro foram maiores em fêmeas com CL e que foram tratadas com eCG ( $15,8 \pm 0,4$ mm) em comparação aos animais

que tinham CL e que não receberam eCG ( $14,1 \pm 0,3$ mm).



**Figura 2 –** Diâmetro do folículo dominante (mm) nos dias 8 e 10, diâmetro do folículo pré-ovulatório (mm) e concentração sérica de progesterona (ng/mL) nos dias 0, 8 e 10 do protocolo de sincronização nos diferentes grupos experimentais

No presente estudo, os CLs do diestro subsequente das vacas com alta concentração de P4 no momento da indução da ovulação e que não foram tratadas com eCG produziram  $4,92 \pm 3,34$ ng/mL de P4, já os CLs do diestro subsequente das vacas com baixa concentração de P4 no momento da indução da ovulação e que foram tratadas com esta glicoproteína produziram  $13,01 \pm 3,88$ ng de P4/mL. Embora o CL do diestro subsequente das vacas com baixa concentração de P4 (no momento da sincronização da ovulação) e tratadas com eCG produzir 2,65 vezes mais P4 que as vacas com alta concentração de P4 (no momento da sincronização da ovulação) e que não receberam este tratamento, não se observou diferença estatística entre esses grupos ( $P = 0,08$ ).

Ferreira et al. (2013) verificaram que o tratamento com eCG no momento da retirada do dispositivo de P4

provocou uma tendência em aumentar o volume (controle:  $7,4 \pm 0,5$ cm<sup>3</sup> e eCG:  $9,8 \pm 0,3$  cm<sup>3</sup>) e as concentrações plasmáticas de P4 (controle:  $3,7 \pm 0,6$ ng/mL e eCG:  $4,7 \pm 0,5$ ng/mL) após 12 dias da ovulação em vacas holandesas de alta produção de leite sincronizadas a um protocolo de IATF. De forma semelhante, Souza et al. (2009) trabalharam também com vacas holandesas e observaram uma tendência de aumento no volume do CL (sem eCG:  $5,6 \pm 0,4$ cm<sup>3</sup> e com eCG:  $6,7 \pm 0,4$ cm<sup>3</sup>) e na concentração de P4 (sem eCG:  $3,5 \pm 0,4$ ng/mL e com eCG:  $5,8 \pm 0,7$ ng/mL) 12 dias após a ovulação.

Pulley et al. (2013) realizaram um estudo sobre o efeito da eCG na dinâmica folicular e luteal em vacas holandesas submetidas ao protocolo Ovsynch e também observaram aumento no volume luteal ( $8,3 \pm 0,5$ cm<sup>3</sup>) em vacas que receberam este

tratamento em comparação as que não receberam ( $7,1 \pm 0,5\text{cm}^3$ ), contudo, semelhante a este trabalho não verificaram efeito desta glicoproteína no acréscimo das concentrações de P4 (controle:  $5,2 \pm 0,5\text{ng/mL}$  e com eCG:  $5,4 \pm 0,6\text{ng/mL}$ ) no dia 9 após o tratamento. Para estes autores a eCG falhou em induzir acréscimo nas concentrações de P4 pela adequada nutrição dos animais. Keynon et al. (2012) também relataram que a aplicação deste fármaco no momento da retirada do dispositivo de P4 promoveu um aumento no volume total (controle:  $6,8 \pm 0,5\text{cm}^3$  e com eCG:  $9,1 \pm 0,6\text{cm}^3$ ), no entanto, falhou em elevar as concentrações de P4 (controle:  $4,2 \pm 0,3\text{ng/mL}$  e com eCG:  $5,6 \pm 0,2\text{ng/mL}$ ) no dia 14 do protocolo de sincronização em vacas holandesas.

Esses resultados podem ser atribuídos a influência da eCG em induzir alterações ao nível tecidual, celular e molecular no CL, as quais estão relacionadas com a capacidade funcional e a síntese de P4 (Moura et al., 2015). O maior volume do CL em resposta ao tratamento com eCG no grupo alta concentração de P4 pode ser explicados pelo efeito da gonadotrofina na população de células da teca e da granulosa, induzindo hiperplasia das pequenas e hipertrofia das grandes células luteais, além de promover aumento no volume de mitocôndrias destas células (Fátima et al., 2012). Ao nível molecular esta glicoproteína promove regulação do metabolismo lipídico e alteração na expressão de proteínas envolvidas na esteroidogênese, como a STAR, elevando a produção de P4 (Rigoglio et al., 2013).

Sabe-se que o fluxo sanguíneo aumenta paralelamente com a concentração circulante de P4 e este determina o *status* funcional do CL (Acosta et al., 2003; Matsui e Myamoto, 2009). Nesta pesquisa, as fêmeas com

alta concentração circulante de P4 e tratadas com eCG no momento da sincronização da ovulação apresentaram área de vascularização do CL subsequente ao protocolo ( $1,05 \pm 0,37\text{cm}^3$ ) semelhante às vacas com baixa concentração de P4 ( $1,21 \pm 0,27$  e  $1,54 \pm 0,39\text{cm}^3$ ;  $P > 0,05$ ; Tabela 1). Este resultado pode ser explicado devido ao efeito luteotrófico da eCG em promover aumento no diâmetro e fluxo sanguíneo do CL (Honmes et al., 2009). Segundo Moura et al. (2015), a eCG promove aumento na densidade vascular, que é essencial para proporcionar melhor função luteal ao CL. Adicionalmente, de acordo com Fátima et al. (2012), esta glicoproteína pode modular a síntese luteal de citokinas, fatores de crescimento como o VEGF e precursores hormonais relacionados com a angiogênese influenciando no suprimento sanguíneo para a produção de P4. O aumento no fluxo sanguíneo ovariano promovido pela administração de eCG no grupo alta concentração de P4 pode ser devido a ativação de moléculas vasodilatadoras e angiogênicas em resposta a esta gonadotrofina (Souza et al., 2016).

## CONCLUSÃO

Diante das condições que foram realizadas este experimento foi possível concluir que o tratamento com eCG não melhorou as características morfológicas do CL de vacas com baixas concentrações de P4 no momento da sincronização ovulação. Observou-se que um ambiente endócrino com alta concentração circulante de progesterona no momento da sincronização da ovulação no protocolo de IATF impactou negativamente o diâmetro e a vascularização luteína. A administração da eCG no momento da remoção do dispositivo de P4 pode ser

utilizada como estratégia para favorecer melhora luteal em fêmeas que apresentam elevados níveis circulantes de progesterona no momento da sincronização da ovulação.

## REFERENCES

- ACOSTA T. J.; HAYASHIKI. G.; OHTANI M. et al. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v. 125, p. 759–767, 2003.
- BARUSELLI, P. S.; SALES, J. N. S.; SALA, R. V. et al. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 9, n.3, p.139-152, 2012.
- BICALHO, R. C.; GALVÃO, K. N.; GUARD, C. L. et al. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. **Theriogenology**, v. 70, p. 199-207, 2008.
- BINELLI, M.; SARTORI, R.; VASCONCELOS, J. L. M. et al. Evolution in fixed-time: from synchronization of ovulation to improved fertility, 2014. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Mario\\_Binelli/publication/268506071\\_Fertility\\_of\\_fixed-time\\_protocols\\_in\\_dairy\\_cattle\\_Evolution\\_in\\_fixed-time\\_from\\_synchronization\\_of\\_ovulation\\_to\\_improved\\_fertility/links/546cf4280cf2a7492c55aefa.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Mario_Binelli/publication/268506071_Fertility_of_fixed-time_protocols_in_dairy_cattle_Evolution_in_fixed-time_from_synchronization_of_ovulation_to_improved_fertility/links/546cf4280cf2a7492c55aefa.pdf)
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MAPLETOFT, R. J.; Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 137-142, 2013.
- CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L. et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.
- DIAS, C. C.; WECHSLER, F. S.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin and timing of prostaglandin F2 $\alpha$  treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 72, p. 378-385.2009.
- HERZOG, K.; BROCKHAN-LUDEMANN; KASKE, M.; BEINDORFF, N. et al. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v. 73, p. 691-697, 2010.
- FÁTIMA L. A.; BINELLI M.; BARUSELLI P. S. et al. Angiogenic and steroidogenic responses of the corpus luteum after superovulatory and stimulatory treatments using eCG and FSH. **Animal Reproduction**, v. 9, n.3, p.273-280, 2012.
- FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; SALES, J. N. S. et al. Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. **Animal reproduction science**, v. 140, n. 1, p. 26-33, 2013.
- HOUGHTON, P. L.; LEMENAGER, R. P.; MOSS, G. E. et al. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. **Jornal Animal Science**, v. 68, p. 1428–1437, 1990.
- HONNENS A.; NIEMANN H.; HERZOG K. et al. Relationships between ovarian blood flow and ovarian response to eCG-treatment of dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.113, p.1–10, 2009.
- KASTELIC, J. P.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic morphology

- of corpora luteal and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. **Theriogenology**, v. 34, n. 3, 1990.
- LONERGAN, P.; O'HARA, L.; FORDE, N. Role of diestrus progesterone on endometrial function and conceptus development in cattle. **Animal Reproduction**, v.10, n.3, p.223-227, 2013.
- LUTTGENAU, J.; BEINDORFF, N.; ULRICH, S. E. et al. Low plasma progesterone concentrations are accompanied by reduced luteal blood flow and increased size of the dominant follicle in dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, p. 12-22, 2011.
- MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, p. 175-180, 2001.
- MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Blood flow on the follicle wall was previously shown to be important for follicle development and function (steroidogenesis). Evaluation of ovarian blood flow by color Doppler ultrasound: Practical use for reproductive management in the cow. **Veterinary Journal**, v. 181, p. 232-40, 2009.
- MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine Chorionic Gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, n.1, p.27-44, 1991.
- MOURA, C. E. B.; RIGOGLIO, N. N.; BRAZ, J. K. F. S et al. Microvascularization of Corpus Luteum of Bovine Treated With Equine Chorionic Gonadotropin. **Microscopy Research and Technique**, v. 78, p. 747-753, 2015.
- PFEIFER, L. F. M.; MAPLETOFT, R. J.; KASTELIC, J. P. et al. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. **Theriogenology**, v. 72, p. 237-1250. 2009.
- PERES, R. F. G.; CLARO JUNIOR, I.; SÁ FILHO, O. G. et al. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v.72, p.681-689, 2009.
- PULLEY S. L.; WALLACE, L. D.; MELLIEON JR. H. I. et al. Ovarian characteristics, serum concentrations of progesterone and estradiol, and fertility in lactating dairy cows in response to equine chorionic gonadotropin. **Theriogenology**, v. 79, p.127–134, 2013.
- RIGOGLIO, N. N.; FÁTIMA, L. A.; HANASSAKA, J. Y. et al. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. **Theriogenology**, v. 79, p. 673-679, 2013.
- ROBERSON M. S.; WOLFE, M. W.; STUMPF, T. T. et al. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biology Reproduction**, v. 41, p. 997-1003, 1989.
- SÁ FILHO, M. F.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; PENTEADO, L. et al. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 182–187, 2010.
- SALES, J. N. S; CARVALHO, J. B.P.; CREPALDI, G. A. et al. Effect of circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time artificial insemination on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelore) beef cows. **Theriogenology**, v. 83, p. 1093-1100, 2015.

SPSS, Statistical Package for Social Science. **Introduction to SPSS for windows version 19**, Chicago, EUA, 2012. 85p.

SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A. et al. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol in reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 72, p. 10-21, 2009.

SOUZA, L. M. M. C.; MENDES, G.P.; CAMPOS, D. B. et al. Equine Chorionic Gonadotropin Modulates the Expression of Genes Related to the Structure and Function of the Bovine Corpus Luteum. **Plos One**, v. 11, n. 10, p. 1-24, 2016.

VASCONCELOS, J. L. M.; PEREIRA, M. H. C.; MENEGHETTI, M. et al. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 206-214, 2013.