

DIEGO FEITOSA LEAL

Utilização de cipionato de estradiol em única aplicação associado à indução da luteólise com prostaglandina $F_{2\alpha}$ para sincronização do estro de matrizes suínas nulíparas

PIRASSUNUNGA

2021

DIEGO FEITOSA LEAL

Utilização de cipionato de estradiol em única aplicação associado à indução da luteólise com prostaglandina F2 α para sincronização do estro de matrizes suínas nulíparas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcilio Nichi

Pirassununga
2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4085
FMVZ

Leal, Diego Feitosa

Utilização de Cipionato de Estradiol em única aplicação associado à indução da luteólise com prostaglandina F_{2α} para sincronização do estro de matrizes suínas nulíparas / Diego Feitosa Leal. – 2021.
52 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcilio Nichi.

1. Sincronização do estro. 2. Pseudogestação. 3. Cipionato de Estradiol. 4. PGF_{2α}. 5. Marrãs. I. Título.



São Paulo, 20 de maio de 2020

CEUAX N 1687040520

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Marcilio Nichi

Área: Reprodução Animal

Equipe envolvida: Diego Feitosa Leal - **executor** (universidade De São Paulo); Mariana Groke Marques - colaborador (embrapa Suínos E Aves, Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária (embrapa));

Título do projeto: "Utilização de ciproionato de estradiol em dose única para sincronização de estro de fêmeas suínas nulíparas por meio da indução de pseudogestação".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 20/05/2020, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LEAL, DIEGO FEITOSA

Título: Utilização de cipionato de estradiol em única aplicação associado a indução da luteólise com prostaglandina F_{2α} para sincronização do estro de matrizes suínas nulíparas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha família!
Aos meus amigos!

AGRADECIMENTOS

Minha mãe, meu pai, obrigado pelo imenso amor e as muitas preces que me sustentaram nessa caminhada.

Gigi, sem seu amor, carinho, cuidados e muita paciência, muita mesmo – e o presente que foi o **Napo e Berê** –, eu não teria conseguido, Amo vocês!

Aos meus grandes amigos que se tornaram colegas de profissão e sócios, André (Carijas) Bruno, Rafa e Matheus (Biras); se um dia eu tiver a metade da inteligência e capacidade de vocês já me darei por satisfeito.

À Harumi que com sua extrema competência sempre me auxiliou com as questões regulamentares da pós-graduação. Obrigado Harumi por tudo; você tornou minha vida na pós-graduação muito mais fácil.

Ao Cabral, meu grande amigo e eterno orientador; sem sua orientação técnica e conselhos sábios eu não teria chegado até aqui. Vou sempre ressaltar que a ideia deste trabalho é sua, eu apenas a coloquei em prática.

Ao amigo e coorientador – não formalmente, mas por consideração – Professor César que me apoiou em um momento extremamente complicado, sendo sua ajuda determinante para minha permanência na pós-graduação.

À Dra. Mariana Groke Marques, por ter aberto as portas da Embrapa para realização deste experimento; sem o seu suporte o presente trabalho não teria saído do papel. Muito obrigado!

Ao meu orientador Marcílio que com seu coração imenso confiou em mim e me acolheu como orientado. Muito obrigado mesmo professor!

Ao meu amigo Cleiton pelo grande auxílio durante a realização do experimento. Saiba que seu suporte foi fundamental para que o experimento desse certo.

À Embrapa Suínos e Aves, por ter me proporcionado um suporte técnico que nunca havia encontrado. Agradeço a todos os funcionários que não mediram esforços para me ajudar.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e da reserva de bancada que foram fundamentais.

RESUMO

LEAL, D.F. **Utilização de cipionato de estradiol em única aplicação associado a indução da luteólise com prostaglandina F_{2α} para sincronização do estro de matrizes suínas nulíparas**. 2021. 52 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, PIRASSUNUNGA, 2021.

O presente estudo objetivou avaliar a efetividade do protocolo de sincronização do estro de fêmeas suínas nulíparas por meio da indução de pseudogestação utilizando cipionato de estradiol em única aplicação seguido pelo uso de PF_{2α} (Cloprostenol Sódico). Para tanto, no dia 12 do ciclo estral (D0 = primeiro dia do estro) 52 fêmeas suínas nulíparas foram distribuídas ao acaso em dois grupos experimentais: CON (n = 22) controle sem aplicação, PSG (n = 30) 10 mg de cipionato de estradiol por via intramuscular. A detecção de estro teve início no dia 17 do ciclo estral. Foram coletadas amostras de sangue por punção jugular para determinação das concentrações hormonais de progesterona e estradiol, tendo início no dia 12 (antes da aplicação do cipionato de estradiol) e a cada 72 horas. No dia 28 (D0 = primeiro dia em estro) as fêmeas pseudogestantes foram tratadas com duas doses (8h00 min e 14h00 min) de 0,263 mg de cloprostenol sódico por via intramuscular, para indução da luteólise. Para avaliação dos efeitos do protocolo sobre a fertilidade, 25 fêmeas foram inseminado e abatidas 5 dias após última inseminação. As fêmeas do grupo CON foram inseminadas a medida que demonstraram estro natural. O tratamento com Cipionato de Estradiol induziu pseudogestação em 90% (27/30) das fêmeas tratadas. A duração do ciclo estral foi maior ($p < 0.0001$) para as fêmeas do grupo PSG em comparação as fêmeas do grupo CON. As fêmeas do grupo PSG demonstraram estro em média $3,96 \pm 0,19$ dias após a indução da luteólise. A duração do estro não diferiu ($p = 0.16$) entre as fêmeas dos grupos experimentais. O número de ovulações foi similar entre as fêmeas do grupo CON e PSG ($p = 0.17$). Nenhuma diferença foi observada na taxa de recuperação de embriões ($p = 0.18$) e número total de embriões por fêmea ($p = 0.06$). Para a análise do desenvolvimento embrionário, a porcentagem de oócitos não fertilizados ($P = 0.26$), de embriões fragmentados ($P = 0.07$), mórula ($p = 0.28$) e blastocistos ($p = 0.28$) foi similar entre as fêmeas do grupo CON e PSG. O tratamento de fêmeas suínas nulíparas com uma única aplicação de 10 mg de cipionato de estradiol no dia 12 do ciclo estral foi efetivo em induzir pseudogestação e a indução da luteólise com PGF_{2α} resultou na sincronização do estro; além disso, o protocolo de sincronização do estro não exerceu efeito deletério sobre a fertilidade e o desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: Sincronização do estro. Pseudogestação. Cipionato de Estradiol. $\text{PGF}_{2\alpha}$.
Marrãs.

ABSTRACT

LEAL, D.F. Use of estradiol cypionate in a single application associated with induction of luteolysis with prostaglandin F₂ α for estrus synchronization in gilts. 2021. 52 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2021**.

The present work was designed to evaluate the effectiveness of using estrogen-induced pseudopregnancy followed by PGF₂ α (cloprostenol sodium) to synchronize estrus in gilts. Thus, on day 12 of the estrus cycle (D 0 = first day of standing estrous), 52 gilts were assigned at random to two experimental groups: non-treated females (CON, n = 22), serving as controls and (PSG, n = 30), a single treatment with 10 mg of estradiol cypionate intramuscularly. Blood samples were collected by jugular venepuncture for estradiol and progesterone determination, starting on day 12 and repeated every 72 hours. Estrus detection started on day 17 and were performed twice daily by direct contact with a mature boar. Gilts from the CON group were inseminated at onset of natural estrous. On d 28 pseudopregnant gilts were treated twice (i.e., 0800 AM and 1400 PM) with 0,263 mg of sodium cloprostenol i.m to induce luteolysis. To assess the effects of the protocol on fertility, a subgroup of 25 females were inseminated and slaughtered 5 days after the last insemination. Treatment with Estradiol Cypionate induced pseudopregnancy in 90% (27/30) of treated females. The duration of the estrous cycle was longer ($p < 0.0001$) for females in the PSG group compared to females in the CON group. Females in the PSG group showed synchronized estrus 4.04 ± 0.8 after induction of luteolysis. The duration of estrus did not differ ($p = 0.16$) between females in the experimental groups. The conception rate was similar ($p = 0.10$) for females from CON and PSG groups. The number of ovulations was similar between females in the CON and PSG groups ($p = 0.17$). No difference was observed in embryo recovery rate ($p = 0.18$) and total number of embryos per female ($p = 0.06$). For the analysis of embryonic development, the percentage of unfertilized oocytes, fragmented embryos and viable embryos was similar among females from CON and PSG groups ($p > 0.05$). Treatment of gilts with a single application of 10 mg of Estradiol Cypionate on day 12 of the estrous cycle was effective in inducing pseudopregnancy and treatment with PGF₂ α resulted in synchronized estrus; in addition, the estrus synchronization protocol exerted no deleterious effect on fertility and embryonic development.

Keywords: Estrus synchronization. Pseudopregnancy. Estradiol Cypionate. PGF₂ α . Gilts.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Linha do tempo representando o desenvolvimento embrionário inicial..... | 23 |
| Figura 2 - Perfil hormonal durante o ciclo estral (A) e gestação (B). | 24 |
| Figura 3 - Esquema ilustrativo do delineamento experimental. | 30 |
| Figura 4 - Média (\pm EPM) da concentração de estradiol das fêmeas tratadas com cipionato de estradiol no dia 12 do ciclo estral | 36 |
| Figura 5 – Média (\pm EPM) da concentração de progesterona das fêmeas do grupo controle e pseudogestantes ao longo do ciclo estral | 36 |
| Figura 6 – Dispersão da manifestação de estro após a indução da luteólise no dia 28 | 37 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Média (\pm EPM) da duração do ciclo estral (dias) e duração do estro (dias) de marrãs submetidas ao protocolo de sincronização do estro utilizando cipionato de estradiol e PGF ₂ α | 35 |
| Tabela 2 – Taxa de fecundação (%), taxa de recuperação de embriões (%), oócitos não fertilizados (%), embriões fragmentados (FG; %), embriões 4-8 células (%), embriões 8-16 células (%), mórula (M; %), mórula compacta (MC; %), blastocisto inicial (BI; %), blastocisto expandido (BE; %) e blastocisto rompido (BR; %) de marrãs submetidas ao protocolo de sincronização do estro utilizando cipionato de estradiol e PGF ₂ α | 38 |
| Tabela 3 - Média (\pm EPM) do número de ovulações e diâmetro dos folículos no dia 12 do ciclo estral (D12) e no início do estro (IE) de marrãs submetidas ao protocolo de sincronização do estro utilizando Cipionato de Estradiol e PGF ₂ α | 39 |
| Tabela 4 - Média (\pm EPM) do tamanho médio das glândulas epiteliais (TMGE, μm^2), da densidade glandular (DG, glandulas/mm ²) e da área do endométrio (AE, μm^2), de marrãs submetidas ao protocolo de sincronização do estro utilizando Cipionato de Estradiol e PGF ₂ α | 39 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2. | REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 2.1. | CICLO ESTRAL DA FÊMEA SUÍNA | 17 |
| 2.1.1. | Fase folicular | 17 |
| 2.1.2. | Fase luteínica..... | 18 |
| 2.1.3. | Momento da ovulação | 18 |
| 2.1.4. | Estrógeno..... | 19 |
| 2.1.5. | Progesterona | 19 |
| 2.2. | CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DO CORPO LÚTEO SUÍNO | 19 |
| 2.3. | GESTAÇÃO DA FÊMEA SUÍNA..... | 21 |
| 2.4. | RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM SUÍNOS..... | 23 |
| 2.5. | SINCRONIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO CICLO ESTRAL DE FÊMEAS SUÍNAS NULÍPARAS | 25 |
| 2.5.1. | Sincronização do ciclo estral de fêmeas suínas por meio da indução de pseudogestação com estradiol | 26 |
| 3. | HIPÓTESES | 27 |
| 4. | OBJETIVOS..... | 27 |
| 5. | MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 5.1. | LOCAL | 28 |
| 5.2. | ANIMAIS | 28 |
| 5.3. | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 29 |
| 5.4. | EXAME ULTRASSONOGRÁFICO DOS OVÁRIOS..... | 31 |
| 5.5. | DETECÇÃO DO ESTRO..... | 31 |
| 5.6. | INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL | 31 |
| 5.7. | ANÁLISES LABORATORIAS | 32 |
| 5.7.1. | Concentração sérica de progesterona e estradiol..... | 32 |
| 5.7.2. | Coleta de embriões | 32 |
| 5.7.3. | Avaliação histológica do epitélio glandular uterino..... | 33 |
| 5.8. | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 33 |

| | | |
|------|---|----|
| 6. | RESULTADOS | 35 |
| 6.1. | INDUÇÃO DE PSEUDOGESTAÇÃO, SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E PERFIL HORMONAL DE PROGESTERONA E ESTRADIOL. | 35 |
| 6.2. | EFEITO DO PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO SOBRE A FERTILIDADE, DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FOLÍCULAR. | 37 |
| 6.3. | EFEITO DO PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO SOBRE O EPITÉLIO GLANDULAR UTERINO..... | 39 |
| 7. | DISCUSSÃO..... | 40 |
| 8. | CONCLUSÕES..... | 45 |
| 9. | REFERÊNCIAS | 46 |

1. INTRODUÇÃO

Na produção de suínos as matrizes nulíparas (marrãs) representam uma das categorias mais importantes dentro do plantel, uma vez que estas serão responsáveis por substituir fêmeas que foram removidas – de forma planejada ou não planejada – e farão a renovação genética do plantel; dessa forma, em uma distribuição etária ideal, espera-se que aproximadamente 20% do rebanho seja composto por marrãs (THINGNES et al., 2015).

Normalmente, um grande número de fêmeas nulíparas em distintas fases do ciclo estral são mantidas a fim de se garantir que estas estejam em estro e passíveis de serem inseminadas em um momento oportuno. Desta forma, a adoção de metodologias efetivas para sincronização do estro de fêmeas suínas de reposição assume um papel central na busca pela eficiência produtiva, uma vez que, esta não somente facilita a entrada das novas matrizes nos grupos de inseminações, mas também, otimiza o uso de instalações como as de gestação e maternidade, permitindo que se trabalhe com o sistema *all in all out* (ESTIENNE et al., 2001).

Outra grande vantagem do controle farmacológico do estro é a possibilidade de associar a esse a sincronização hormonal da ovulação e, dessa forma, inseminar as matrizes em um momento fixo (BENNETT-STEWARD et al., 2007; BRUSSOW et al., 2009; KNOX et al., 2011; DRIANCOURT et al., 2013), a qual, por sua vez, traz enormes benefícios como a diminuição da necessidade no uso de mão de obra, uma vez que existe a possibilidade de não se detectar o estro para que as inseminações sejam realizadas e também na redução do número de doses inseminantes utilizadas por fêmea/ano (HUHN et al., 1996; DEGENSTEIN et al., 2008).

Na atividade suinícola, a sincronização hormonal do ciclo estral é realizada exclusivamente por meio do uso de um progestágeno sintético comercial (altrenogest) o qual, apesar da sua reconhecida efetividade e de ser isento de efeito deletério sobre os ciclos reprodutivos subsequentes (WEBEL; DAY, 1982; DAY, 1984; GORDON, 1997; ESTIENNE et al., 2001; HORSLEY et al., 2005; MARTINAT-BOTTÉ et al., 2010) apresenta custo muito elevado e sua administração é de certa maneira laboriosa já que se faz necessário que um funcionário administre o produto juntamente com a alimentação por períodos que podem alcançar 18 dias.

Um protocolo alternativo para sincronização hormonal do estro de marrãs, com o intuito de facilitar sua entrada nos grupos de matrizes em reprodução, poderia ser obtido pela modulação do ambiente endócrino na fase luteínica, por meio da administração exógena de

estradiol entre os dias 11 e 14 (D0 = primeiro dia em estro) do ciclo estral (GUTHRIE, 1975; HAZELEGER; KIRKWOOD; SOEDE, 2001). Com esse regime de tratamento hormonal, mimetiza-se a sinalização embriotrófica a qual é realizada por meio da produção de sulfato de estrona (E1SO4) e 17 β -estradiol (E2) entre os dias 11 e 15 do ciclo estral, resultando na alteração do padrão secretório endometrial de PGF_{2 α} (GEISERT et al., 1987; VOS et al 1999; FRAN CZAK; KOTWICA, 2008; BAZER et al., 2010; WACLAWIK, 2011; BAZER; JOHNSON, 2014), e assim induzindo uma pseudogestação.

Em acréscimo, outro fator associado com a indução de pseudogestação em fêmeas suínas, por meio da aplicação exógena de estradiol, é uma melhora nos aspectos qualitativos da leitegada oriundas das fêmeas submetidas a tais protocolos, possivelmente por alterações do ambiente uterino (ZAVY et al., 1988), uma vez que, esse regime de tratamento hormonal durante os períodos que coincidem aos do reconhecimento materno da gestação, estimula a tradução e secreção de proteínas específicas no epitélio luminal uterino envolvidas no processo de implantação, tornando o útero de fêmeas nulíparas mais maduros (SONG et al., 2009; BAZER et al 2011; BAZER; JOHNSON, 2014).

Desta maneira, a utilização da sincronização estral por meio da indução de pseudogestação, apresenta-se como um método em potencial para otimização da eficiência reprodutiva de marrãs, as quais, de uma maneira geral, produzem leitegadas menos numerosas e mais leves em comparação às porcas (QUESNEL et al., 2007; HOGE; BATES, 2010), uma característica que é fortemente influenciada pela maturidade do ambiente uterino (FREKING; LENTS; VALLET, et al., 2016).

É importante salientar que o corpo lúteo suíno não é responsivo à ação da prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}) antes do dia 12 do ciclo estral (CHANG; FRANDSEN; GADSBY 2017), diferindo do que ocorre com outras espécies nas quais a PGF_{2 α} induz luteólise a partir dos dias 5 e 7 do ciclo estral (ZORRILLA et al., 2013), no entanto, corpos lúteos de fêmeas suínas gestantes ou pseudogestantes respondem facilmente ao tratamento com PGF_{2 α} , o qual promove retorno ao estro dentro de 4 e 7 dias (GADSBY; SMITH; ALMOND 1991). Esse retardo na aquisição de capacidade luteolítica pelo corpo lúteo suíno inviabiliza a sincronização de cio como realizada em fêmeas bovinas, as quais após tratamento com PGF_{2 α} , ou um dos seus análogos, promove cessação da atividade do corpo lúteo, acompanhada pela queda dos níveis séricos de progesterona e manifestação de estro de forma precoce (BRUSVEEN et al., 2009).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar: 1) A efetividade do cipionato de estradiol em estender a fase luteínica quando aplicado em dose única no dia 12 do ciclo

estral; 2) A efetividade do uso da $\text{PGF}_{2\alpha}$ para induzir luteólise de fêmeas suínas pseudogestantes para sincronização do estro; e 3) O reflexo do protocolo de sincronização do estro sobre a fertilidade e desenvolvimento embrionário de matrizes suínas nulíparas púberes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CICLO ESTRAL DA FÊMEA SUÍNA

O ciclo estral da fêmea suína tem duração média de 21 dias (18-24 dias), sendo dividida em fase folicular (3-7 dias) e fase luteínica (13-15 dias) (SOEDE et al., 2011)

2.1.1. Fase folicular

A fase folicular do ciclo estral da fêmea suína tem duração de 3 a 7 dias e ocorre após a fase luteínica ou lactação. No início da fase folicular, dependendo das concentrações periféricas de progesterona (fase lútea) ou dos efeitos supressores da lactação, os folículos antrais do *pool* proliferativo – geralmente com diâmetro de 2 a 4 mm – são recrutados e começam a se desenvolver (GUTHRIE, 2005).

Os folículos antrais presentes no início da fase folicular se desenvolveram durante a fase luteínica do ciclo estral ou durante a lactação, consistindo em uma média de 100 folículos de até 6 mm. Por sua vez, o recrutamento de folículos do *pool* proliferativo tem início quando a liberação pulsátil de GnRH/LH muda de um padrão de menor frequência/menor amplitude para um padrão de maior frequência/menor amplitude (SOEDE et al., 2011).

A liberação pulsátil do GnRH estimula a liberação de LH e FSH da pituitária anterior; o FSH é importante para aumentar o número de folículos que atingem a categoria de tamanho médio (recrutamento); já o LH é necessário para o crescimento adicional desses folículos (seleção) para tamanho pré-ovulatório (KNOX et al., 2005). De fato, folículos com cerca de 4 mm de diâmetro começam a expressar receptores de LH nas células da granulosa e, a partir desse momento, deixam de ser dependentes de FSH, passando a ser dependentes de LH para o seu desenvolvimento e subsequente ovulação (GUTHRIE, 2005). Uma vez que o LH tenha estimulado o desenvolvimento de folículos grandes apresentando número suficiente de receptores de LH, esses começam a produzir 17β -estradiol (SOEDE et al., 2011). Como os folículos de pequeno diâmetro não possuem receptores de LH suficientes e são, portanto, dependentes de FSH, eles sofrem atresia quando as concentrações periféricas de FSH

diminuem (LUCY et al., 2001). O restante da fase folicular é caracterizado por um maior desenvolvimento de folículos grandes dependentes de LH e um aumento da atresia dos folículos de médio e pequeno diâmetro (FLOWERS et al., 1991). Os folículos recrutados ainda podem sofrer atresia durante a fase folicular, mas uma vez selecionados, escapam da atresia e, eventualmente, ovulam apresentando um diâmetro de 8–11 mm durante a fase de estro (KNOX et al., 2005).

2.1.2. Fase luteínica

No início da fase luteínica, imediatamente após a ovulação, as concentrações periféricas de progesterona encontram-se em níveis basais e, praticamente, não há folículos antrais nos ovários em decorrência das concentrações elevadas de estrógeno e inibina previamente à ovulação. A secreção de inibina e estrógeno declinam após a ovulação, removendo o *feedback* negativo sobre o FSH. As concentrações periféricas de FSH aumentam um a dois dias após a ovulação, o que induz uma onda de desenvolvimento folicular sincronizada e aumento do número de folículos pequenos e médios. A produção de inibina por esses folículos aumenta o que reduz as concentrações periféricas de FSH. Os corpos lúteos em desenvolvimento produzem quantidades crescentes de progesterona, que atingem as concentrações máximas entre os dias 8 e 9 após a ovulação, também suprimindo a secreção de LH. O número de folículos antrais parece aumentar até o dia 9, mas os folículos permanecem relativamente pequenos (1-3 mm), resultando em concentrações mínimas de 17β -estradiol (KNOX et al., 2003).

O restante da fase luteínica é marcada pelo contínuo crescimento e atresia de folículos antrais pequenos que não chegam a atingir a dominância (SOEDE et al., 2011).

2.1.3. Momento da ovulação

O estro é definido como o período de receptividade sexual e ovulação durante o qual a fêmea aceita o macho e é capaz de conceber. O estro puberal ou primeiro estro geralmente ocorre por volta de 150 a 210 dias de idade. Em porcas, o estro normalmente tem início dentro de três a cinco dias após o desmame (SOEDE; KEMP, 1997).

A ovulação na espécie suína ocorre sempre em um momento relativamente constante, isto é, depois de transcorridos $72 \pm 8\%$ do estro, independentemente da duração do estro, que pode variar entre 24 e 76 h. Isso significa que em fêmeas com duração do estro de apenas 24

horas, a ovulação ocorreria aproximadamente 17 horas após o início do estro; por outro lado, fêmeas com duração do estro de 76 horas, a ovulação ocorreria 53 horas após o início do estro (SOEDE et al., 1994).

2.1.4. Estrógeno

As concentrações circulantes de estrógeno começam a aumentar juntamente com o declínio repentino dos níveis de progesterona, atingindo o seu pico ($27,8 \pm 17$ pg/ml) um a dois dias antes do estro, em resposta ao crescimento e maturação dos folículos de Graaf durante o final do próestro (SOEDE et al., 1994). Após o próestro, os níveis de estrógeno declinam, permanecendo baixo (< 1 pg/mL) durante a fase luteínica (NOGUCHI et al., 2011).

2.1.5. Progesterona

A progesterona é secretada pelo corpo lúteo, córtex da adrenal e placenta e desempenha um papel fundamental na implantação, regulação do desenvolvimento uterino, secreção uterina, desenvolvimento da glândula mamária e lactogênese (BAZER; JOHNSON, 2014). Em fêmeas suínas as concentrações plasmáticas de progesterona aumentam rapidamente de menos de 1 ng/mL, no dia do estro, para cerca de 30 ng/mL, entre os dias 12-14 do ciclo estral ou gestação. Em fêmeas não gestantes, em resposta a regressão corpo lúteo induzida pela $PGF_{2\alpha}$, as concentrações de progesterona começam a diminuir rapidamente a partir do dia 15 do ciclo estral, declinando para menos de 1 ng/mL no dia 18 do ciclo (KA et al., 2018). Em fêmeas gestantes, por sua vez, as concentrações de progesterona diminuem lentamente entre o dia 14-30, permanecendo entre 10-20 ng/mL durante o restante da gestação (BAZER, 2013).

2.2. CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DO CORPO LÚTEO SUÍNO

O corpo lúteo é uma glândula endócrina transitória responsável não somente pela produção do hormônio mantenedor da gestação, a progesterona, mas também pelo controle do próprio ciclo ovariano. Sua formação envolve eventos moleculares complexos semelhantes aos observados nos processos de reparo tecidual e formação de tumores, com envolvimento de intensa angiogênese (SKARZYNSKI et al., 2013).

Na ausência do sinal embriotrófico para sua manutenção o corpo lúteo sofre a ação do seu agente luteolítico natural, a $\text{PGF}_{2\alpha}$, este se liga ao seu receptor localizado na membrana plasmática de células luteínicas grandes, resultando na ativação da fosfolipase A2 que, por sua vez, leva a geração de trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol no interior das células; esses segundos mensageiros causam aumento da concentração do cálcio (Ca^{2+}) livre no interior das células luteínicas, o qual é liberado de suas reservas localizadas no retículo endoplasmático liso e, este aumento de cálcio além de estar relacionado com a desorganização estrutural de células luteínicas (luteólise estrutural) também promove ativação da proteína kinase C (PKC), esta última causa fosforilação de proteínas específicas, culminando na interrupção da esteroidogênese (luteólise funcional) (STOCCO et al., 2002).

O corpo lúteo suíno, diferente de outras espécies domésticas, apresenta refratariedade luteolítica prolongada, tornando-se sensível à $\text{PGF}_{2\alpha}$ apenas após o dia 12 do ciclo estral, apesar de apresentar expressiva quantidade de receptores de $\text{PGF}_{2\alpha}$ desde a fase luteínica inicial (PRZYGRODZKA et al., 2015). Levando em consideração a quantidade de receptores existente no corpo lúteo suíno, e o fato deste responder a múltiplas administrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ mesmo antes de adquirir sensibilidade luteolítica, talvez este atraso esteja relacionado com a não ativação de vias moleculares iniciadas pós ligação $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Receptor (ZORRILLA et al., 2013).

De fato, para que ocorra a desorganização celular no processo de luteólise estrutural, as vias extrínsecas ou a intrínseca da apoptose devem ser ativadas. A via intrínseca é iniciada por vários fatores nocivos como radicais livres formados no interior das células e envolve a ativação de peptídeos da família Bcl-2, mais notadamente o peptídeo Bax; este promove um aumento da permeabilidade da mitocôndria o que faz com que o citocromo C (Cyto-c) seja liberado para o citosol, esta enzima então ativa a caspase-9, a qual, por sua vez, ativa a caspase-3 (caspase executora) que é essencial para o processo de degradação de proteínas e fragmentação do DNA, causando morte celular. Já a via extrínseca, pode ser ativada pela ligação do $\text{TNF-}\alpha$ ao seu receptor o que resulta na ativação da caspase-8 e da executora caspase-3 (EMINE et al., 2007; SUGINO; OKUDA, 2007). Vale ressaltar, que a caspase-8 também pode ser ativada pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ e talvez esta possa ser a explicação para que repetidas doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ causam luteólise antes do dia 12 (ZORRILLA et al., 2013).

A infiltração de macrófagos seguida de posterior liberação de citocinas pró-inflamatórias, mais notadamente o fator de necrose tumoral α ($\text{TNF-}\alpha$), interleucinas e interferons, bem como fatores de crescimento e remodeladores de tecido, no tecido luteínico durante o ciclo estral, é um dos diversos mecanismos implicados na aquisição de capacidade

luteolítica, não somente do corpo lúteo suíno mas também de outras espécies de animais domésticos (CHANG; FRANDSEN; GADSBY, 2017) inclusive em seres humanos (WU et al., 2004) e camundongos (CARE et al., 2013). Em suínos, mais especificamente, é observado que a concentração intraluteal de macrófagos é quatro vezes maior no dia 12 do ciclo estral quando comparados aos dias 4 e 6 o que ocorre em paralelo ao processo de aquisição de sensibilização do corpo lúteo à ação da $PGF2\alpha$ (ZHAO et al., 1998) bem como, com o período no qual o concepto suíno secreta estradiol o qual, por sua vez, age tanto no endométrio (ação antiluteolítica) quanto no ovário (luteotrófica) promovendo o reconhecimento materno da gestação (BAZER; JOHNSON, 2014).

2.3. GESTAÇÃO DA FÊMEA SUÍNA

A gestação na espécie suína dura em média 114 dias, tendo início após a fecundação dos oócitos na junção ampola-istmo do oviduto. Em seguida à fecundação, os embriões entram em rápido processo de divisão celular e migram em direção ao útero, atingindo o ambiente uterino aproximadamente 72 horas após o início do estro, no estágio embrionário de quatro células, e se tornam blastocisto por volta do dia 5 após a fecundação. O blastocisto esférico (0,5–1 mm de diâmetro) então rompe a zona pelúcida, entre os dias 6-7, e expande até atingir entre 2 e 6 mm no dia 10. A partir desse momento, o desenvolvimento dos embriões suínos apresenta características que os distingue de outras espécies de mamíferos. De fato, por volta dos dias 11 e 12, após início do estro, os blastocistos iniciam o processo de expansão do seu trofotoderma de forma rápida (0,25 mm/h), atingindo o tamanho de 1000 mm por volta do dia 16 da gestação (Figura 1) (BAZER; JOHNSON, 2014).

Na espécie suína, a manutenção da produção de progesterona pelo corpo lúteo ocorre entre os dias 11-12 e 15-20 após início do estro e a habilidade dos conceptos em produzirem e secretarem estrógenos (principalmente 17β -estradiol) durante esse período é considerado como o sinal de reconhecimento materno da gestação (WACLAWIK, 2011).

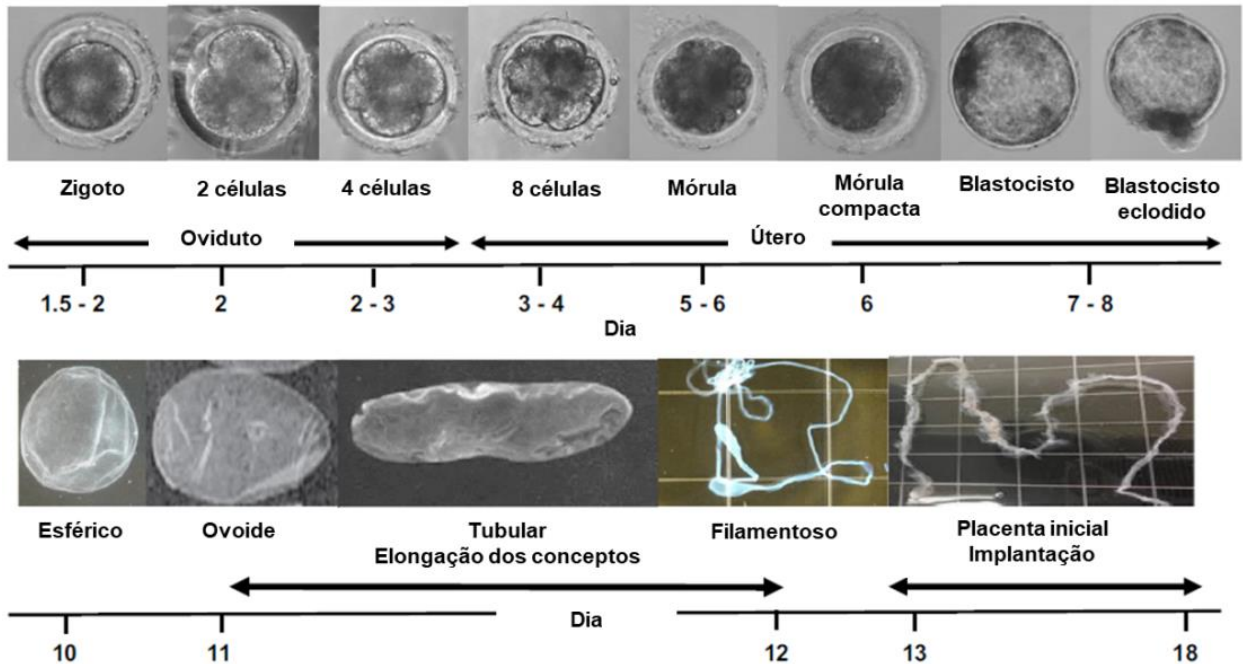
Antes da implantação os embriões se encontram livres no ambiente intrauterino e dependem do produto secretório do epitélio glandular uterino, denominado coletivamente como histotrofo, como suporte nutricional. O histotrofo, por sua vez, é constituído por diversos componentes, incluindo proteínas transportadoras, fatores de crescimento, íons, mitógenos, enzimas, hormônios, aminoácidos, vitaminas, glicose, frutose dentre outras moléculas regulatórias do desenvolvimento embrionário (GEISERT; SCHMITT, 2002).

O processo de implantação dos conceptos tem início no dia 14 de gestação. A *down regulation* dos receptores de progesterona (PGR) no epitélio glandular e luminal uterino, em resposta a estimulação contínua da própria progesterona, é um dos principais eventos que marcam o início do período de implantação. A *down regulation* de PGR induzida pela progesterona resulta em uma diminuição da expressão de Mucina-1 na superfície apical do epitélio luminal uterino e na exposição de integrinas para adesão do trofoblasto (WACLAWIK, 2011). É nesse período que o processo de placentação tem início. A placenta tem a função primária de troca de gases respiratórios, micronutrientes e macromoléculas além de produzir hormônios que regulam o desenvolvimento fetal durante toda a gestação. O período de maior desenvolvimento placentário ocorre entre os dias 20 e 70 da gestação, quando então a placenta encontra-se completamente formada (em relação à quantidade total de aureolas). Nos suínos, a placenta é do tipo epiteliocorial e, dessa forma, o epitélio luminal uterino permanece intacto durante toda a gestação, não havendo contato direto entre a circulação sanguínea materna e fetal (BAZER; JOHNSON, 2014).

O dia 30 de gestação marca o início da fase fetal, a qual é caracterizada pela organogênese e mineralização do esqueleto, é nesse período que ocorre a formação das fibras musculares. O último terço da gestação é marcado por intenso crescimento fetal e desenvolvimento do aparelho mamário. Nessa fase os fetos apresentam crescimento elevado, podendo chegar a 4,63 gramas por dia (MCPHERSON et al., 2004).

A maturação do eixo hipotálamo-hipófise adrenal dos leitões e o aumento da liberação de cortisol pelas adrenais fetais estimulam a expressão da 17 α -hidroxilase pela placenta, resultando na metabolização de progesterona em andrógenos e aromatização de andrógenos em estrógenos. (BAZER; JOHNSON, 2014). O estrógeno se liga aos seus receptores no endométrio, resultando na expressão de receptores de ocitocina; por sua vez a ocitocina se liga aos seus receptores estimulando a síntese de PGF_{2 α} . A PGF_{2 α} leva a regressão dos corpos lúteos e, conseqüentemente, ocorre rápido declínio da concentração circulante de progesterona (DE RENSIS et al., 2012). Contrações uterinas intensas tem início em resposta a queda da progesterona e da expressão de receptores uterinos de ocitocina, o que culmina com a expulsão dos fetos (BAZER; JOHNSON, 2014).

Figura 1 - Linha do tempo representando o desenvolvimento embrionário inicial.



Fonte: Adaptado de Geisert et al (2020).

2.4. RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM SUÍNOS

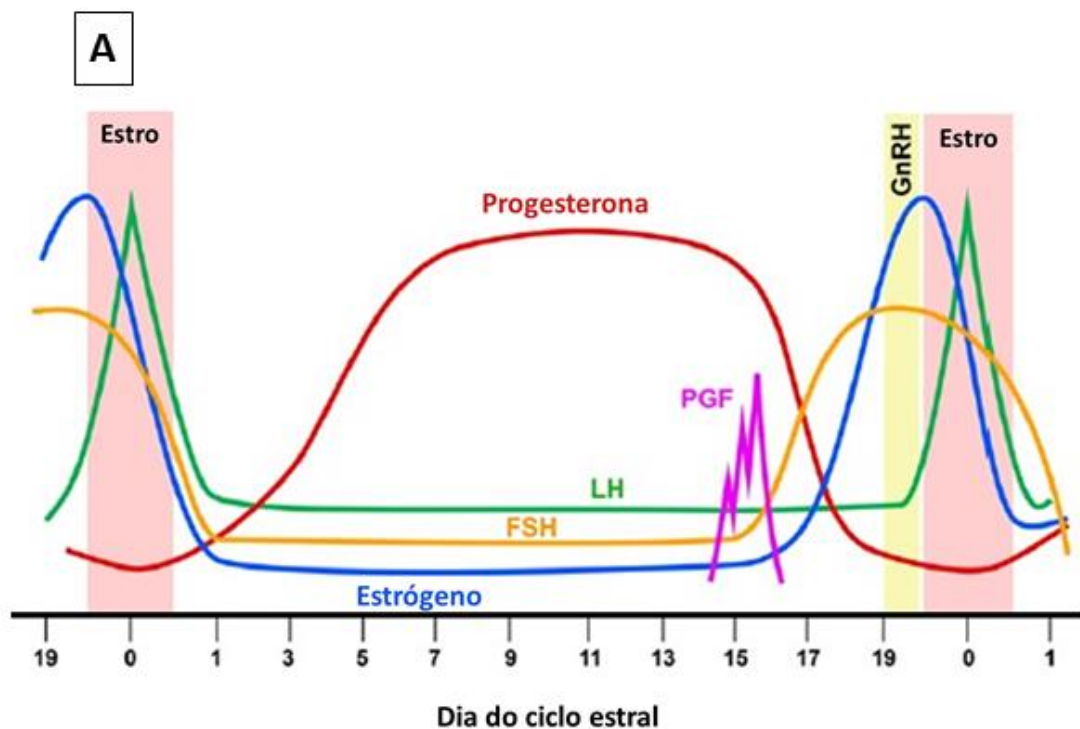
O adequado estabelecimento gestacional em mamíferos requer o prolongamento da atividade luteínica e consequente produção de progesterona; a progesterona, dentre outras ações, atua sobre o endométrio, estimulando a atividade secretória das glândulas uterinas necessárias para a implantação e desenvolvimento dos conceitos (BAZER et al., 2010), mantém o miométrio em estado de quiescência (MCCRACKEN et al., 1999), suprime a resposta imune uterina (ARCK et al., 2007) e bloqueia a liberação de GnRH pelo hipotálamo (BASHOUR; WRAY, 2012)

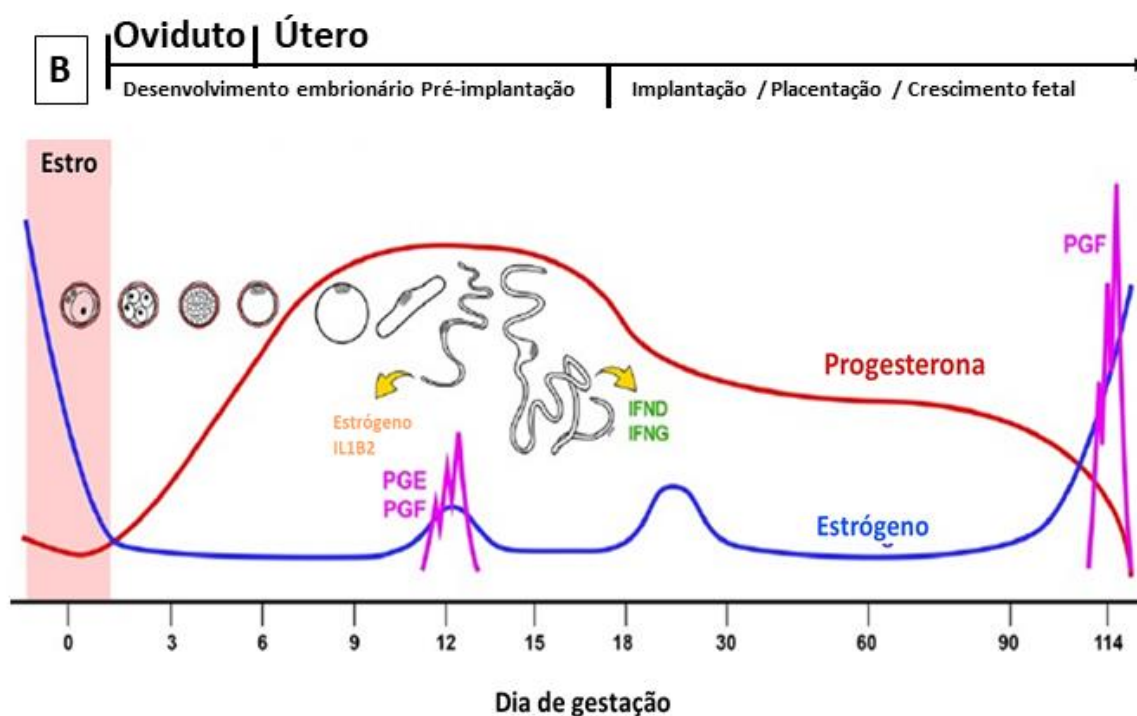
Na espécie suína, o estabelecimento da gestação dá-se entre os dias 10-12 após início do estro e a habilidade dos conceitos em produzir e secretar estrógenos durante esse período é considerado como o sinal de reconhecimento materno da gestação, o qual resulta na extensão da fase luteínica e, em consequência, na manutenção de níveis elevados de progesterona (GEISERT et al., 1990; WACLAWIK, 2011; KA et al., 2018). Adicionalmente, a produção embrionária de estrógenos estimula o aumento da expressão gênica no epitélio luminal uterino, resultando na síntese de uma grande variedade de fatores que exercem efeito sobre o próprio epitélio luminal e também, sobre o trofotoderma embrionário, criando um ambiente que confere suporte à implantação e desenvolvimento dos conceitos (BAZER et al., 2008).

O reconhecimento materno da gestação ocorre de forma concomitante à mudança de fase do trofoblasto de esférico para tubular e depois filamentosos, entre os dias 10-12 da gestação. Neste período o concepto suíno apresenta crescente atividade secretora de estrógenos, principalmente 17β -estradiol, em dois períodos, tendo início entre os dias 11-12 (1,400 pg em lavado uterino), e entre os dias 15-20 para a manutenção da gestação (BAZER; JOHNSON, 2014).

Os estrógenos produzidos pelos conceptos suínos possuem ações antiluteolíticas e luteotróficas, incluindo a estimulação da expressão de receptores de LH pelos corpos lúteos, aumento da produção de progesterona, redirecionamento da secreção de $PGF_{2\alpha}$ de endócrina para o lúmen uterino, e regulação da síntese e sinalização de prostaglandinas no endométrio, favorecendo a secreção de PGE_2 em detrimento da $PGF_{2\alpha}$ (BAZER; THATCHER 1977; BAZER et al., 2009; 2011, WACLAWIK, 2011; BAZER; JOHNSON, 2014).

Figura 2 - Perfil hormonal durante o ciclo estral (A) e gestação (B).





Fonte: adaptado de Ka et al (2018).

2.5. SINCRONIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO CICLO ESTRAL DE FÊMEAS SUÍNAS NULÍPARAS

As fêmeas suínas nulíparas compõem uma das categorias mais numerosas do rebanho reprodutivo de uma granja, sendo essas mantidas grandes lotes e em diferentes fases do ciclo estral, aguardando sua entrada nos grupos de inseminação (BORTOLOZZO et al., 2009).

Um programa adequado de introdução de marrãs à vida reprodutiva traria como principais vantagens a redução no número de matrizes mantidas em fase não produtiva, nos custos com alimentação, na otimização do uso de instalações e organização da mão de obra (NOGUCHI et al., 2010). Diante disto, o uso de ferramentas que possibilitem controlar o momento do estro de fêmeas suínas nulíparas a serem inseminadas, potencializaria o manejo reprodutivo do rebanho (KRAELING; WEBEL, 2015).

Diferente do que ocorre com porcas desmamadas, as quais o período lactacional sincroniza naturalmente o estro, as marrãs requerem um regime de tratamento hormonal para essa finalidade (MARTINAT-BOTTÉ et al., 2010). A principal abordagem farmacológica de sincronização do estro para fêmeas suínas nulíparas é por meio da administração de 20 mg/d por períodos de até 18 dias de um progestágeno sintético, ativo por via oral, denominado

allyl-trembolone ou Altrenogest, já que na espécie suína o encurtamento da fase luteínica por meio da utilização de $\text{PGF}_{2\alpha}$ só é possível após o dia 12 do ciclo estral (CUSHMAN et al., 1999).

O Altrenogest quando administrado por via oral mimetiza as ações biológicas da progesterona sobre o hipotálamo, bloqueando a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e consequentemente do hormônio luteinizante (LH) e, assim, permite que ocorra a regressão luteal espontânea sem que novos folículos sejam ovulados (HAZELEGER; KIRKWOOD; SOEDE, 2001). Após a cessação do tratamento oral com Altrenogest, mais de 85% das fêmeas apresentam estro sincronizado dentro de 5 a 7 dias, podendo então ser inseminadas (KRAELING; WEBEL, 2015).

2.5.1. Sincronização do ciclo estral de fêmeas suínas por meio da indução de pseudogestação com estradiol

Estudos nos quais matrizes suínas tratadas com repetidas aplicações de 10 mg de benzoato de estradiol (EB) dos dias 11 a 14 (D_0 = primeiro dia em estro) (GUTHRIE, 1975), ou 5mg de valerato de estradiol (EV) entre os dias 11 e 15 (D_0 = primeiro dia em estro) (ZAVY et al., 1988) ou ainda com uma única aplicação de 20 mg de dipropionato de estradiol (EDP) no 12º dia após início do estro (NOGUCHI et al., 2010; NOGUCHI et al., 2013), obtiveram resultados bastante promissores, uma vez que, houve extensão da fase luteínica em mais de 36 dias sem no entanto ocorrer qualquer comprometimento à função ovariana após término do tratamento. Vale ressaltar que, nestes estudos houve influência do momento da aplicação, do tipo e dose do éster de estradiol utilizado sobre o tempo de manutenção do corpo lúteo. De fato, já foi reportado ser possível estender o intervalo entre estros por até 60 dias após tratamento com repetidas aplicações de EB do dia 11 a 15 do ciclo estral, com a sincronização do estro ocorrendo em seguida à aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ para regressão do corpo lúteo (GUTHRIE, 1975; KRAELING et al., 1975; KRAELING; RAMPACEK, 1977; ZAVY et al., 1988; PUSATERI et al., 1996). No entanto, a necessidade de múltiplas aplicações hormonais é de certa forma um empecilho para a ampla utilização comercial dessa metodologia em programas de sincronização do estro, pois onera o protocolo além de ser desvantajoso com relação ao uso de mão de obra e do ponto de vista do bem-estar animal (CUSHMAN et al., 1999).

A influência do momento da aplicação exógena de estradiol e consequente aumento da viabilidade do corpo lúteo, guarda estreita relação com o período de maior produção deste

hormônio pelo conceito em expansão e, por isso, requer que os níveis de estradiol estejam elevados durante estes períodos (GEISERT et al., 1982). Dando suporte ao exposto, vale ressaltar que a produção de estradiol pelo concepto suíno é 50 vezes maior no dia 12 de seu desenvolvimento quando comparado ao dia 14 e 16 (FRANCZAK; KOTWICA, 2008).

Outro fator de influência, diz respeito à fonte do éster de estradiol utilizado no protocolo de sincronização, já que esse pode apresentar uma meia vida mais curta (3 dias) como o EB (MARTÍNEZ et al., 2005), meia vida média (de 7-8 dias) como o EV (ORIOWO et al., 1980) ou ainda uma meia vida longa (até 17 dias) como o EDP, um éster de estradiol utilizado em medicina humana (NOGUCHI et al., 2010) e disponível de forma comercial apenas no Japão, Macedônia e utilizado em veterinária na Austrália. No entanto, em nenhum dos estudos disponíveis na literatura foi utilizado o Cipionato de Estradiol, um éster com baixa hidrossolubilidade e, por essa característica, a sua liberação do local de aplicação ocorre de forma mais lenta, prolongando a concentração sérica de estradiol por até 12 dias em fêmeas bovinas, quando administrado nas doses de 5 a 10 mg (VYNCKIER et al., 1990); em razão disso, os níveis periféricos de estradiol seriam mantidos elevados durante os períodos necessários para prolongamento da função luteínica em suínos utilizando apenas uma única aplicação.

3. HIPÓTESES

- 1- O cipionato de estradiol administrado em dose única no dia 12 do ciclo estral é efetivo em estender a fase luteínica, induzindo pseudogestação em fêmeas suínas nulíparas;
- 2- É possível sincronizar o estro de fêmeas suínas em pseudogestação, induzida pelo tratamento com cipionato de estradiol em dose única no dia 12 do ciclo estral, após indução da luteólise com $\text{PGF}_{2\alpha}$;
- 3- A sincronização do estro com cipionato de estradiol não exerce efeito deletério sobre a função reprodutiva, não afetando de forma negativa a fertilidade e o desenvolvimento embrionário;

4. OBJETIVOS

O presente trabalho objetivou avaliar:

- A efetividade do cipionato de estradiol em estender a fase luteínica, induzindo pseudogestação quando aplicado em dose única no dia 12 do ciclo estral;
- A efetividade do uso da PGF_{2α} para induzir luteólise de fêmeas suínas pseudogestantes para sincronização do ciclo estral;
- O reflexo deste protocolo de sincronização sobre a fertilidade e o desenvolvimento embrionário;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais realizados de acordo com os padrões legais e éticos do comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ-USP) sob o protocolo número 1687040520 e comissão de ética no uso de animais (CEUA/Embrapa, suínos e aves) sob o protocolo 023/2018.

5.1. LOCAL

O experimento foi realizado no campo experimental de suínos da Embrapa Suínos e Aves localizada no distrito de Tamanduá, Santa Catarina, Brasil (27°18'48"7 "S 51°59'34"07"O), entre fevereiro e abril de 2019.

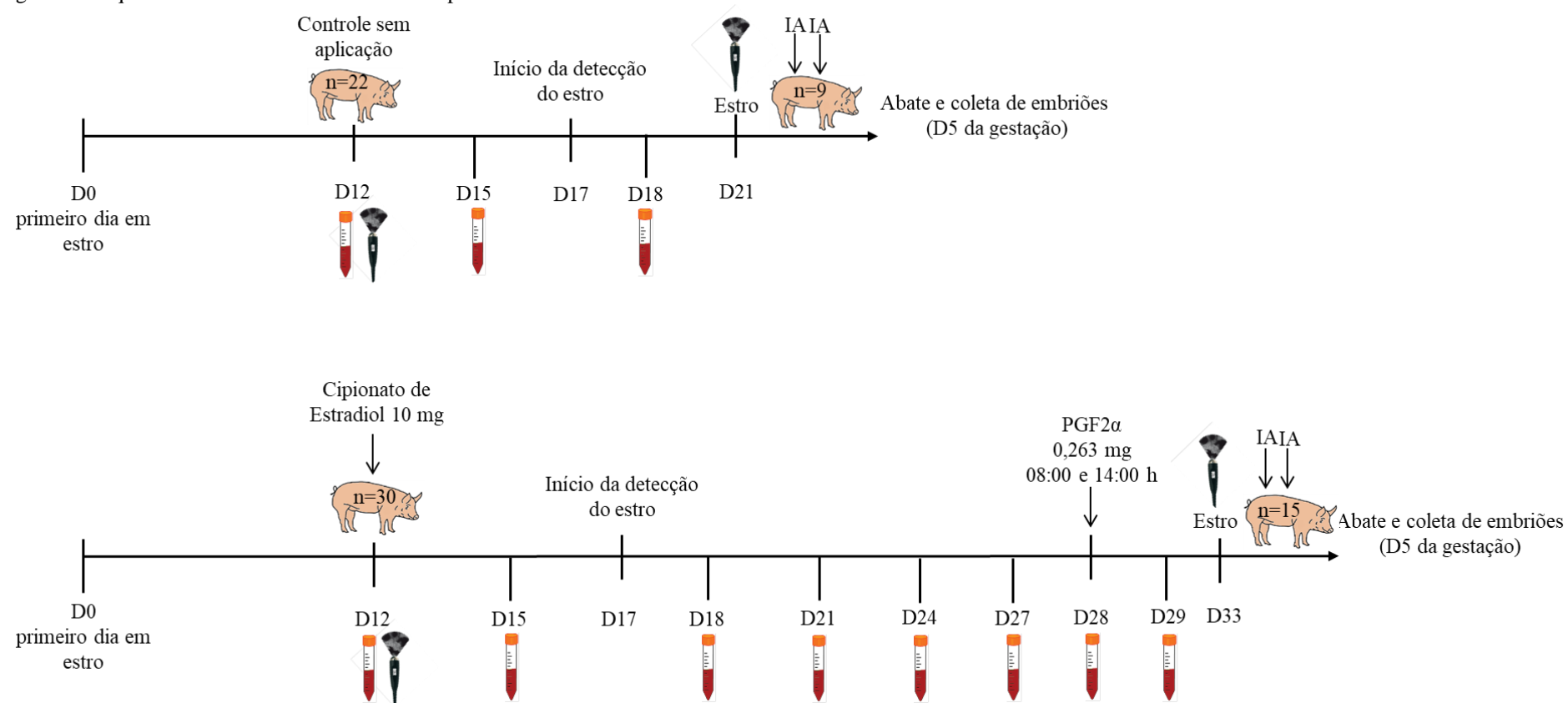
5.2. ANIMAIS

Foram utilizadas 52 fêmeas suínas nulíparas, sendo 25 fêmeas da linhagem MS115, Embrapa (Pietrain x Large White x Duroc) e 27 fêmeas cruzadas (Large White x Landrace) com idade média de 220 ± 5 dias, 140 ± 3 kg de peso vivo e pelo menos três ciclos estrais. Durante todo o período experimental as fêmeas foram alojadas em baias coletivas com dimensões de 4,5 x 3,4, as quais possuíam gaiolas individuais de acesso livre, com piso de concreto parcialmente ripado e bebedouros tipo chupeta. As fêmeas foram arraçadas com ração padrão de gestação (2930 kcal EM por kg/d, 16% de PB e 0,6% de Lis) duas vezes ao dia, totalizando 2,4 kg/d.

5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental está apresentado na Figura 3. No dia 12 do ciclo estral (D0 = primeiro dia do estro) 52 fêmeas suínas nulíparas foram distribuídas de forma aleatória (delineamento inteiramente casualizado) em dois grupos experimentais: Controle (n = 22) sem aplicação, PSG (n = 30) 10 mg de cipionato de estradiol (SincroCP[®] 10 mg/mL de cipionato de estradiol, Ourofino Saúde animal, Cravinhos SP, Brasil) por via intramuscular. Foram coletadas amostras de sangue por punção jugular para determinação das concentrações hormonais de progesterona e estradiol, tendo início no dia 12 (antes da aplicação do cipionato de estradiol) e a cada 72 horas. No dia 28 (D0 = primeiro dia em estro) as fêmeas pseudogestantes foram tratadas com duas doses (8h00 min e 14h00 min) de 0,263 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio[®], Ourofino Saúde animal, Cravinhos SP, Brasil) por via intramuscular, para indução da luteólise. O estabelecimento de pseudogestação foi definido como ausência de sinais de estro e manutenção do nível de progesterona acima de 1 ng/mL entre os dias 12 e 28. Para avaliação dos efeitos do protocolo sobre a fertilidade, 25 fêmeas da linhagem MS115 foram inseminadas e abatidas cinco dias após última inseminação.

Figura 3 - Esquema ilustrativo do delineamento experimental.



Fonte: Leal (2021)

Legendas: US, ultrassonografia; IA, inseminação artificial.

5.4. EXAME ULTRASSONOGRÁFICO DOS OVÁRIOS

Todas as fêmeas foram submetidas a avaliações ultrassonográficas dos ovários, por via transabdominal, utilizando um aparelho compacto (Imago.S, IMV Immaging UK Ltd, Bellshill, Scotland), com transdutor setorial, na frequência de 5MHz. O aparelho de ultrassom possuía a função *cine-loop* que possibilitou a gravação de vídeos de até 10 s, permitindo a identificação posterior dos maiores folículos em um ovário. As avaliações foram realizadas em dois momentos: no primeiro dia do experimento (dia 12 do ciclo estral; D0 = primeiro dia em estro), para confirmar que as fêmeas do grupo controle e tratamento estavam em um momento similar do ciclo estral e no primeiro dia do estro, para mensuração do diâmetro dos folículos pré-ovulatórios. No momento do exame a superfície de contato do transdutor foi coberta com gel de carboximetilcelulose para garantir a propagação do som de forma adequada. A média dos três maiores folículos apenas do ovário direito foi utilizada para determinar o diâmetro dos folículos, como já descrito em outros experimentos (WABERSKI et al., 2001; SOEDE et al., 2007; CHEN et al., 2012).

5.5. DETECÇÃO DO ESTRO

A detecção do estro teve início no dia 17 do ciclo estral (D0 = primeiro dia em estro), sendo realizada duas vezes ao dia (08h00 min e 15h00 min) com o auxílio de um macho suíno adulto que era levado até a baia destinada a detecção do estro. A ocorrência de estro foi definida pelo teste de tolerância positivo na presença do macho por meio da aplicação de pressão lombar, observado pela primeira vez.

5.6. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Foram inseminadas 24 fêmeas suínas nulíparas (MS115, Embrapa), sendo nove fêmeas do grupo controle e 15 fêmeas do grupo PSG. Todas as fêmeas foram inseminadas no momento em que o estro foi identificado pela primeira vez e a cada 24 h (inseminação intra-cervical), com sêmen refrigerado diluído (3×10^9 espermatozoides; >80% motilidade). O sêmen de um mesmo macho foi utilizado para as fêmeas dentro de cada lote, dessa forma as fêmeas do grupo CON e PSG foram inseminadas com o mesmo ejaculado.

5.7. ANÁLISES LABORATORIAS

5.7.1. Concentração sérica de progesterona e estradiol

Para mensurar a concentração sérica de progesterona e estradiol foram obtidas amostras de sangue no dia 12 do ciclo estral (D0 = primeiro dia em estro) e a cada 72 horas até o dia 29 (D0 = primeiro dia em estro) para as fêmeas do grupo pseudogestante, ou até que o estro fosse observado pela primeira vez, para as fêmeas do grupo controle. As coletas foram realizadas por punção jugular utilizando agulha 40 x 12 e seringa sem anticoagulante. Foram coletados 10 mL de sangue o qual permaneceu na seringa a temperatura ambiente para formação de coágulo. O soro foi transferido para tubos cônicos de 15 mL e então submetido à centrifugação (1500g por 10 min). Após centrifugação, o soro foi transferido para microtubos em duplicata e, em seguida, foi mantido congelado a - 20 °C até a realização das análises.

A quantificação hormonal de progesterona e estradiol foi realizada pela técnica de radioimunoensaio de fase sólida utilizando kits comerciais (RIA PROGESTERONE, Beckman Coulter and RIA 17 β -ESTRADIOL, Beckman Coulte). A determinação dos níveis de estradiol foi realizada apenas para as fêmeas do grupo tratamento.

5.7.2. Coleta de embriões

Imediatamente após o abate (no dia cinco de gestação), o conjunto composto por cérvix, útero, ovidutos e ovários foram identificados e acondicionados em caixa térmica, sendo então transferidos para o Laboratório de Sanidade e Genética Animal da Embrapa Suínos e Aves (LSGA) para averiguação da taxa de ovulação e determinação do número de embriões. Foram coletados fragmentos de útero para avaliação histológica. Os embriões foram coletados por lavagem uterina de acordo com Marques et al. (2019) e classificados de acordo com a IETS. Para tanto, aproximadamente 20-30 centímetros dos cornos uterinos proximais aos ovários foram dissecados, assim como os ovidutos. A extremidade distal da secção do útero foi obliterada com auxílio de pinça hemostática. Após completa dissecação do oviduto, foi localizada a entrada do infundíbulo e nela inserida uma sonda plástica acoplada à seringa de 20 ml, contendo PBS com 1% de soro fetal bovino para a realização da lavagem. O conteúdo líquido do oviduto foi então massageado em direção ao corno uterino. A junção útero-tubárica foi obliterada com auxílio de pinça hemostática e o oviduto retirado. Uma segunda lavagem foi realizada com a inserção da sonda plástica na região caudal do útero, a

qual estava previamente obliterada com pinça. O corno uterino foi suspenso pela região caudal, e o conteúdo líquido deslocado por massagem em direção à junção útero-tubárica. A extremidade cranial foi liberada e inserida em um tubo cônico de centrifuga de 50 mL. O líquido que contém os embriões foi recuperado por gravidade, pela suspensão da região caudal do corno uterino e por massagem dos cornos para deslocamento do líquido. O lavado obtido foi colocado em placas de Petri de 100 mm e observado em estereomicroscópio para recuperação dos embriões. A taxa de concepção foi determinada pela presença de embriões em lavados dos cornos uterinos. A taxa de ovulação foi determinada pela contagem dos corpos lúteos dos dois ovários.

5.7.3. Avaliação histológica do epitélio glandular uterino

No dia 5 da gestação fragmentos uterinos de aproximadamente 4 cm² foram coletadas da região central do corno uterino esquerdo; a região central foi escolhida para padronizar a análise. As avaliações do epitélio glandular foram realizadas como descrito por Muro et al (2020). Após a coleta, as amostras foram armazenadas em formalina tamponada a 10% por 24 h e, após esse período, foram processadas para histologia. Para tanto, seções (4 µm) foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina, como descrito por Prophete et al. (1992). Três imagens por lâmina foram salvas usando a objetiva de 4x (área total de cada imagem = 7,45 mm²). As imagens foram capturadas como arquivos "jpeg", utilizando um microscópio (Leica DM500) acoplado a uma câmera de alta definição (Leica ICCD50 HD). A densidade glandular (GD, glândulas/mm²) foi determinada pelo número de glândulas dividido pela área do endométrio nos campos observados. A área endometrial foi medida individualmente para cada campo histológico, do topo do epitélio luminal ao miométrio, usando a ferramenta *freehand selections* do software ImageJ[®]. A área glandular média (MGA, µm²) foi definida como o tamanho médio de cada estrutura glandular. A área média de 50 glândulas por fotomicrografia foi medida usando o software ImageJ[®]. O mesmo observador, em avaliação às cegas, realizou todas as análises histológicas.

5.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas no SAS versão 9.4 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC). Todos os dados foram testados quanto à normalidade com o teste Shapiro-Wilk, O procedimento PROC RANK com a opção NORMAL foi usada para produzir uma

variável transformada normalizada para as variáveis que não seguiam distribuição normal. As concentrações plasmáticas de progesterona ao longo do tempo foram analisadas por medidas repetidas usando o procedimento PROC MIXED de SAS. A matriz de variância-covariância foi modelada com a opção não estruturada no SAS, o seguinte modelo foi escolhido:

$$y_{ijt} = \mu + a_i + d_{j(i)} + \gamma_t + (\alpha\gamma)_{it} + \varepsilon_{ijt}$$

No qual y_{ijt} é a concentração do metabólito no sangue medida em tempo t na j -ésima matriz atribuída o i -ésimo tratamento, μ é o efeito médio geral, a_i é o i -ésimo efeito do tratamento, $d_{j(i)}$ é o efeito aleatório da j -ésima matriz no i -ésimo tratamento, γ_t é o efeito fixo no tempo em que a medição foi realizada, $(\alpha\gamma)_{it}$ é o efeito de interação fixo entre tratamento e tempo, ε_{ijt} o erro aleatório associado à j -ésima matriz atribuída ao i -ésimo tratamento no tempo t . Todos os dados foram descritos como LSMEANS e o maior erro padrão (EPM) de cada variável foi utilizado. As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0.05$. As médias dos tempos de avaliação foram comparadas pelo teste de Tukey com $p < 0,05$ sendo considerado significativo. O número de corpos lúteos, o número total de embriões, a taxa de recuperação de embriões entre os grupos experimentais e as análises das glândulas endometriais foram comparados pelo teste t ; as variáveis referentes ao desenvolvimento embrionário foram analisadas pelo teste de Wilcoxon com $p < 0.05$ sendo considerado significativo

6. RESULTADOS

No início do experimento, 52 fêmeas foram selecionadas para compor os grupos experimentais, dessas, uma fêmea pertencente ao grupo controle não retornou ao estro após o início do experimento; a mesma apresentava folículos pequenos ao exame ultrassonográfico. Assim, foram utilizadas 51 fêmeas no total, sendo 21 pertencentes ao grupo CON e 30 pertencentes ao grupo PSG.

6.1. INDUÇÃO DE PSEUDOGESTAÇÃO, SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E PERFIL HORMONAL DE PROGESTERONA E ESTRADIOL.

O tratamento com uma única aplicação de cipionato de estradiol no dia 12 do ciclo estral induziu pseudogestação em 90% (27/30) das fêmeas do grupo PSG. A duração do ciclo estral foi maior ($p < 0.0001$) para as fêmeas do grupo PSG em comparação as fêmeas do grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1 - Média (\pm EPM) da duração do ciclo estral (dias) e duração do estro (dias) de marrãs submetidas ao protocolo de sincronização do estro utilizando cipionato de estradiol e PGF2 α .

| Variáveis | Tratamento | | EPM | P |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|-------|---------|
| | CON (n = 21) | PSG (n = 30) | | |
| Duração do ciclo estral (dias) | 20,67 ^a | 31,69 ^b | 0,320 | <0.0001 |
| Duração do estro (dias) | 2,32 | 2,24 | 0,161 | 0.72 |

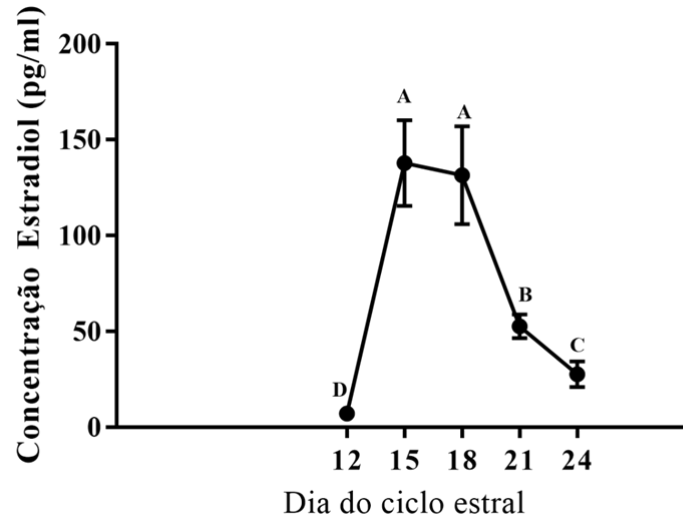
Fonte: Leal (2021).

Legendas: CON, grupo controle; PSG, grupo pseudogestação (fêmeas tratadas com 10 mg de cipionato de estradiol no dia 12 do ciclo estral e 0,526 mg de cloprostenol sódico no dia 28).

^{a-b} Letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística ($P < 0.05$)

A concentração sérica de estradiol das fêmeas do grupo PSG se manteve elevada por seis dias após tratamento com Cipionato de estradiol (Figura 4). Todas as fêmeas pseudogestantes demonstraram estro sincronizado em média $3,96 \pm 0,19$ dias após indução da luteólise (Figura 5). A concentração de progesterona das fêmeas do grupo PSG permaneceu acima de 5 ng/mL do dia 12 até o dia 28 ($p < 0.0001$); em contraste, para as fêmeas do grupo CON, a concentração de progesterona declinou para valores abaixo de 1 ng/mL no dia 18 do ciclo estral ($p = 0.0003$). A concentração de progesterona das fêmeas do grupo PSG declinou ($p < 0.0001$) para valores abaixo de 1 ng/mL 24 horas após a indução da luteólise (Figura 6). A duração do estro não diferiu entre os grupos experimentais (CON, $2,32 \pm 0,16$; PSG, $2,24 \pm 0,16$; $p = 0.16$).

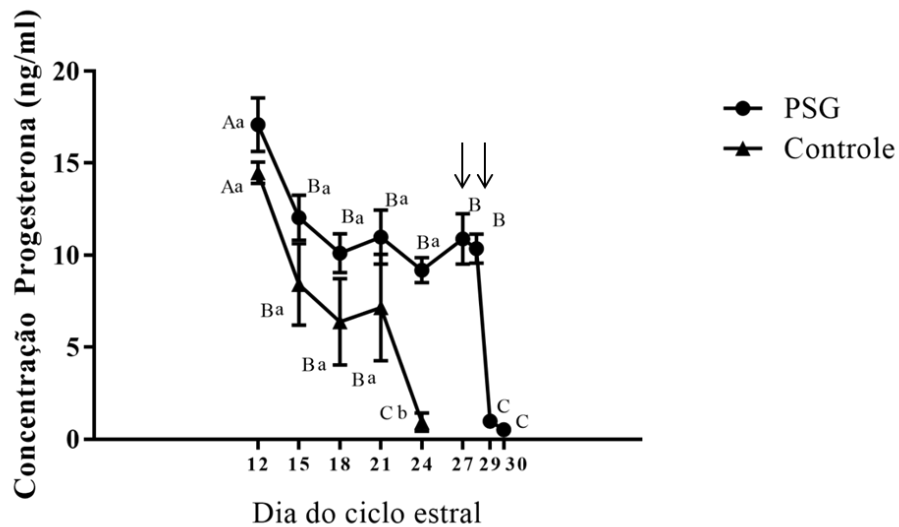
Figura 4 - Média (\pm EPM) da concentração de estradiol das fêmeas tratadas com cipionato de estradiol no dia 12 do ciclo estral



Fonte: Leal (2021).

A-B-C-D Letras maiúsculas representam diferença estatística ($p < 0.05$).

Figura 5 – Média (\pm EPM) da concentração de progesterona das fêmeas do grupo controle e pseudogestantes ao longo do ciclo estral



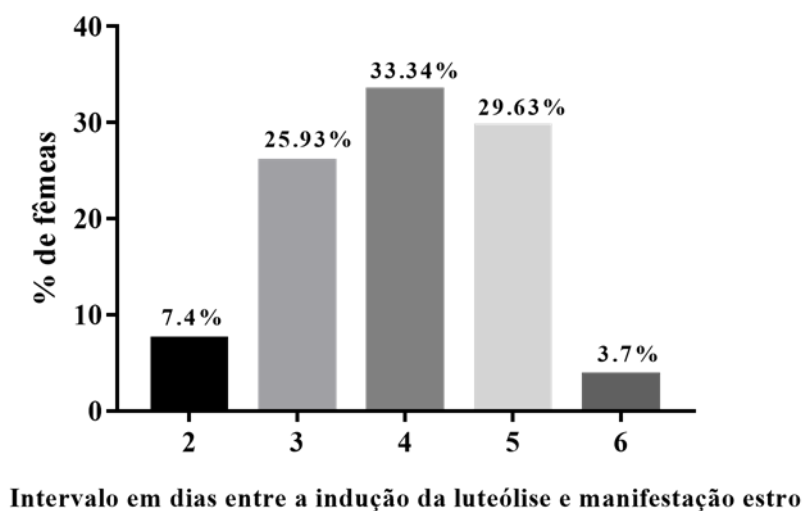
Fonte: Leal (2021).

Legendas: PSG, grupo pseudogestação (fêmeas tratadas com 10 mg de cipionato de estradiol no dia 12 do ciclo estral e 0,526 mg de cloprostenol sódico no dia 28); setas indicam o dia da indução da luteólise com cloprostenol sódico.

^{a-b} Letras minúsculas representam diferença estatística entre os grupos experimentais ($p < 0.05$).

^{A-B-C} Letras maiúsculas representam diferença estatística entre os tempos ($p < 0.05$).

Figura 6 – Dispersão da manifestação de estro após a indução da luteólise no dia 28



6.2. EFEITO DO PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO SOBRE A FERTILIDADE, DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FOLÍCULAR.

As informações referentes a taxa de recuperação de embriões e desenvolvimento embrionário estão descritas na Tabela 2. A taxa de concepção não diferiu entre os grupos experimentais (CON, 88,9%; PSG 93,3%; $p = 0.10$). O número de ovulações foi similar entre as fêmeas do grupo CON e PSG ($p = 0.17$). Nenhuma diferença foi observada na taxa de recuperação de embriões ($p = 0,18$). Para a análise do desenvolvimento embrionário, a percentagem de oócitos não fertilizados, de embriões fragmentados e de embriões viáveis foi similar entre as fêmeas do grupo CON e PSG. O diâmetro médio dos folículos no dia 12 do ciclo estral foi semelhante entre os grupos experimentais ($p = 0.58$). O diâmetro médio dos folículos no início do estro foi maior ($p < 0.001$) para as fêmeas do grupo PSG em comparação as fêmeas do grupo CON (Tabela 3).

Tabela 2 – Taxa de fecundação (%), taxa de recuperação de embriões (%), oócitos não fertilizados (%), embriões fragmentados (FG; %), embriões 4-8 células (%), embriões 8-16 células (%), mórula (M; %), mórula compacta (MC; %), blastocisto inicial (BI; %), blastocisto expandido (BE; %) e blastocisto rompido (BR; %) de marrãs submetidas ao protocolo de sincronização do estro utilizando cipionato de estradiol e PGF2 α .

| | Variáveis | | | Classificação dos embriões | | | | | | | |
|-----------------|-------------------|---------------------|--------------------------|----------------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|--------------|------------|-------------|------------|
| | Taxa de concepção | Taxa de recuperação | Oócitos não fertilizados | FG | 4-8 Cel | 8-16 Cel | M | MC | BI | BE | BR |
| CON (n= 9) | 8 (88,8) | 78 (77,0) | 14 (17,9) | 1 (1,5) | 14 (21,8) | 5 (7,8) ^a | 20 (31,2) ^a | 8 (12,5) | 5 (7,8) | 7 (10,9) | 4 (6,2) |
| PSG (n = 15) | 14 (93,3) | 163 (87,5) | 19 (11,6) | 7 (4,8) | 34 (23,6) | 33 (22,9) ^b | 24 (16,6) ^b | 29 (20,1) | 5 (3,4) | 3 (2,1) | 9 (6,2) |

Fonte: Leal (2021).

Legendas: CON, grupo controle; PSG, grupo pseudogestação (fêmeas tratadas com 10 mg de Cipionato de Estradiol no dia 12 do ciclo estral e 0,526 mg de cloprostenol sódico no dia 28).

^{a-b} Letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística ($P < 0.05$)

Tabela 3 - Média (\pm EPM) do número de ovulações e diâmetro dos folículos no dia 12 do ciclo estral (D12) e no início do estro (IE) de marrãs submetidas ao protocolo de sincronização do estro utilizando Cipionato de Estradiol e PGF_{2 α} .

| Variável | CON (n = 9) | PSG (n = 15) | P |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------|
| Número de ovulações (n) | 12,5 \pm 0,5 | 14,0 \pm 0,90 | 0.17 |
| Diâmetro do folículo D12* (mm) | 2,2 \pm 0,5 | 2,3 \pm 0,3 | 0.58 |
| Diâmetro do folículo IE* (mm) | 7,47 \pm 0,40 ^a | 8,16 \pm 0,60 ^b | < 0.001 |

Fonte: Leal (2021).

Legendas: CON, grupo controle; PSG, grupo pseudogestação (fêmeas tratadas com 10 mg de Cipionato de Estradiol no dia 12 do ciclo estral e 0,526 mg de cloprostenol sódico no dia 28).

*Média dos três maiores folículos observados no início do estro.

^{a-b} Letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística ($P < 0.05$)

6.3. EFEITO DO PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO SOBRE O EPITÉLIO GLANDULAR UTERINO.

O tamanho médio das glândulas endometriais foi maior ($p = 0.04$) para as fêmeas do grupo PSG em comparação ao grupo controle. Não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais para as variáveis densidade glandular (CON, 75,517 \pm 4,2; PSG, 84,798 \pm 3,061; $p = 0.08$) e área endometrial (CON, 1811,13 \pm 100,750; PSG, 1790,36 \pm 102,760; $p = 0.89$) (tabela 3).

Tabela 4 - Média (\pm EPM) do tamanho médio das glândulas epiteliais (TMGE, μm^2), da densidade glandular (DG, glandulas/mm²) e da área do endométrio (AE, μm^2), de marrãs submetidas ao protocolo de sincronização do estro utilizando Cipionato de Estradiol e PGF_{2 α} .

| Variáveis | Tratamento | | P |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|------|
| | CON (n = 9) | PSG (n = 15) | |
| TMGE | 2349,92 \pm 180,98 ^a | 3082,52 \pm 315,86 ^b | 0.04 |
| DG | 75,517 \pm 4,20 | 84,798 \pm 3,06 | 0.08 |
| AE | 1811,13 \pm 100,75 | 1790,36 \pm 102,76 | 0.89 |

Fonte: Leal (2021)

Legendas: CON, grupo controle; PSG, grupo pseudogestação (fêmeas tratadas com 10 mg de cipionato de Estradiol no dia 12 do ciclo estral e 0,526 mg de cloprostenol Sódico no dia 28).

^{a-b} Letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística ($P < 0.05$)

7. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que uma única aplicação de 10 mg de Cipionato de Estradiol no dia 12 do ciclo estral foi capaz de prolongar a fase luteínica em 90% das fêmeas tratadas. Ademais, todas as fêmeas pseudogestantes demonstraram estro sincronizado após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Os resultados do presente experimento estão de acordo com os observados em outros estudos que avaliaram o protocolo de sincronização do estro baseado na indução de pseudogestação e administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$. De fato, Noguchi et al., (2011), demonstraram que uma única aplicação de 20 mg de dipropionato de estradiol (EDP), entre 8-11 dias após a ovulação (correspondendo a 10-13 dias após o início do estro), resultou em uma taxa de pseudogestação de 90%, com 100% das fêmeas pseudogestantes demonstrando estro sincronizado entre $5,5 \pm 0,1$ dias após aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$. No entanto, no mesmo estudo, quando fêmeas foram tratadas com EDP, 5 ou 13 dias após a ovulação, a taxa de indução de pseudogestação foi de 60 e 40%, respectivamente. No mesmo sentido, repetidas aplicações de 5 mg de valerato de estradiol do dia 11 ao dia 15 (D0 = primeiro dia em estro) resultou em uma taxa de indução de pseudogestação de 100%, com 92% das fêmeas pseudogestantes demonstrando estro $4,9 \pm 0,2$ dias após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (ZAVY et al., 1988). Ainda nesse sentido, Cushman et al., (1999) relataram que uma única aplicação de 100 mg de estradiol de liberação lenta – preparado farmacológico experimental composto por estradiol incorporado a microesferas de poli (L-acido láctico) – no dia 14 após a indução da ovulação com PG600 (400 UI de PMSG e 200 UI de HCG), resultou em uma taxa de pseudogestação de 86%, sendo o estro sincronizado em 100% das fêmeas após o tratamento com $\text{PGF}_{2\alpha}$. De maneira similar, Noguchi et al., (2010) obtiveram uma taxa de 82% de pseudogestação utilizando uma única aplicação de 20 mg de EDP no dia 12 do ciclo estral (D0 = primeiro dia do estro), e 83% das fêmeas pseudogestantes apresentaram sinais de estro $5,7 \pm 0,3$ dias após aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Em conjunto, esses resultados demonstram ser possível sincronizar o estro de fêmeas suínas induzindo pseudogestação e luteólise e que o sucesso do protocolo guarda estreita relação com o momento do ciclo estral em que o estrógeno é aplicado. De fato, em fêmeas suínas gestantes, as concentrações de estrógenos no lúmen uterino aumentam de maneira bifásica, entre 11-12 dias da gestação e entre 15-30 dias, resultando no primeiro e segundo períodos de reconhecimento materno da gestação (WACLAWIK et al., 2017). Estudos já demonstraram que o aumento das concentrações de estrógeno durante os períodos referidos também é necessário para induzir pseudogestação (GUTHRIE et al., 1975; ZAVY et

al., 1980; GADSBY et al., 1991). Desta maneira, a aplicação do estradiol de forma precoce ou tardia comprometeria a taxa de pseudogestação e, conseqüentemente, o número de fêmeas sincronizadas. Corroborando com o exposto, a administração de estrógeno antes do dia 9 e após o dia 16 do ciclo estral (D0 = primeiro dia em estro) não foi capaz de prolongar a funcionalidade do corpo lúteo (GEISERT et al., 1987). É importante salientar que no presente experimento, a avaliação da concentração sérica de estradiol demonstrou que essa permaneceu elevada durante o período necessário para o estabelecimento da gestação ou pseudogestação em suínos. Dando suporte ao exposto, marrãs tratadas com benzoato de estradiol (EB) entre os dias 9,5-12,5 do ciclo estral (D0 = primeiro dia em estro), apresentaram ciclo estral com duração de 29 dias; no entanto, aplicações repetidas de 5 mg ou 10 mg de EB entre os dias 11-15 ou 11-14, resultaram em um intervalo entre estros de 60 dias (KRAELING et al., 1975; GUTHRIE, 1975). Porém, uma única aplicação de EB 9,5, 11 ou 12,5 dias após o início do estro não foi capaz de induzir pseudogestação (GEISERT et al., 1987). É importante ressaltar que no presente experimento, o Cipionato de Estradiol foi aplicado no dia 12 do ciclo estral, sendo que o primeiro dia em estro foi considerado como o D0, o que corresponderia, aproximadamente, a 10-11 dias após a ovulação. Optou-se por não considerar o momento da ovulação como o D0, para que o protocolo pudesse ser mais facilmente aplicável à prática de granjas comerciais; dessa forma, considerar o primeiro dia em estro como o D0, minimiza as chances de administrar o Cipionato de Estradiol fora do período ideal, independentemente da duração do estro.

Em nosso estudo, a concentração de progesterona das fêmeas tratadas com Cipionato de Estradiol se manteve acima de 5 ng/mL do dia 12 até o dia 28, declinando de 9,63 ng/mL para menos de 1ng/mL, um dia após a indução da luteólise. Nossos resultados foram semelhantes aos observados em marrãs tratadas com múltiplas aplicações de EB ou uma única aplicação de EDP para indução de pseudogestação; nestes estudos o declínio da progesterona para menos de 1ng/mL ocorreu 21-57 horas e 24-48 horas após o tratamento com PGF_{2α}, respectivamente (GADSBY et al., 1991; NOGUCHI et al., 2010; 2011). É importante que a concentração de progesterona decline de forma rápida após a luteólise, do contrário, a manutenção de concentrações relativamente altas de progesterona após a regressão do corpo lúteo pode comprometer a pulsatilidade de LH; dessa forma, a liberação de LH seria suficiente para o desenvolvimento dos folículos antrais, mas ao mesmo tempo insuficiente para estimular a ovulação, o que faz com que os folículos não ovulados se tornem cistos ovarianos (CASTAGNA et al., 2004; TUMMARUK; KESDANGSAKONWUT, 2012).

A duração do estro na espécie suína é muito variável (24-72 horas) (SOEDE et al., 1992), podendo chegar em alguns casos a 96 horas (WEITZE et al. 1994); no entanto, de uma maneira geral, as marrãs apresentam uma menor duração do estro (24-48 horas) em comparação as porcas (24-56 horas) (SOEDE et al., 1997). Em nosso trabalho, não foram observadas diferenças na duração do estro entre as fêmeas dos grupos experimentais; além disso, a duração do estro observada está de acordo com o descrito para marrãs. Esse resultado reforça ainda mais a ausência de efeito deletério do protocolo sobre a atividade ovariana, em decorrência de anormalidades endócrinas, a qual, por sua vez, está entre os fatores que podem afetar a duração do estro (CASTAGNA et al., 2004). Nossos resultados foram similares aos encontrados em outros estudos utilizando estradiol e PGF_{2α} como protocolo de sincronização do estro; no experimento de Noguchi et al., (2010) a duração do estro das fêmeas do grupo tratamento e controle foi de $2,3 \pm 0,3$ e $2,3 \pm 0,2$, respectivamente. Porém, Zavi et al., (1988) observaram uma maior duração do estro para fêmeas submetidas a pseudogestação utilizando 5 mg de valerato de estradiol do dia 11 ao dia 15 (D0 = primeiro dia em estro), em comparação às do grupo controle (2,8 e 1,7 dias, respectivamente). Ainda nesse contexto, o intervalo entre o final do protocolo e início do estro bem como a duração do estro são similares aos de fêmeas suínas sincronizadas com altrenogest (SOEDE et al., 2007, WANG et al., 2018).

No presente experimento, as avaliações ultrassonográficas dos ovários demonstraram que o diâmetro dos folículos no dia 12 do ciclo estral foi similar entre as fêmeas de ambos os grupos experimentais, demonstrando que as fêmeas utilizadas estavam em um momento similar do ciclo estral. No entanto, o exame do ovário no início do estro revelou que as fêmeas submetidas ao protocolo de sincronização do estro apresentavam folículos maiores em comparação as fêmeas do grupo controle. De maneira similar, o tamanho dos folículos no início da fase folicular e os ovulatórios, foi maior em fêmeas sincronizadas com altrenogest (SOED et al., 2007; VAN LEEUWEN et al., 2011). Vale ressaltar que o aumento do diâmetro dos folículos no início da fase folicular e os pré-ovulatórios está associado à melhora do microambiente intrafolicular, com repercussões sobre a qualidade oocitária e uniformidade dos blastocistos (GLASGOW et al., 1999; FERGUSON et al. 2004; FERGUSON et al., 2007; ASHWORTH, 2008; WEAVER et al., 2013). É importante enfatizar, ainda, que evidências de estudos demonstram que a qualidade dos oócitos ovulados possui papel determinante na viabilidade e sobrevivência embrionária (ZACK et al., 1997; ASHWORTH et al., 2009; FOXCROFT et al., 2007). Com efeito, Xie et al. (1990) demonstraram que oócitos com menor grau de maturação resultam em zigotos menos desenvolvidos, sendo esses os primeiros

embriões eliminados quando a capacidade uterina se torna limitante para o desenvolvimento dos conceitos (após o dia 30 da gestação). Apesar disso, em nosso experimento não foi observado nenhuma efeito positivo do aumento do tamanho dos folículos, observados no início do estro, sobre o desenvolvimento embrionário inicial.

Um aspecto importante a se evidenciar diz respeito ao fato do protocolo de sincronização do estro utilizado no presente experimento não ter exercido qualquer efeito deletério sobre a fertilidade. De fato, não houve diferença na taxa de concepção entre os grupos experimentais; além disso, a taxa de concepção das fêmeas submetidas ao protocolo de sincronização está de acordo com valores considerados ideais (SOEDE et al., 1995) e observados em estudos que utilizaram Altrenogest para sincronização do estro (MARTINAT-BOTTÉ et al., 1995; 2010). No mesmo contexto, a avaliação do desenvolvimento embrionário demonstrou que a percentagem de embriões viáveis coletados no dia 5 da gestação foi similar entre os grupos experimentais. De forma semelhante, Hirayama et al., (2019) relataram que a taxa de embriões viáveis foi de 80% quando marrãs tiveram o estro sincronizado utilizando EDP e PGF_{2α}; já Guthrie et al., (1975), esse valor foi de 89% para fêmeas submetidas ao protocolo de sincronização do estro utilizando EB e PGF_{2α}.

Outro benefício associado à utilização de protocolos de sincronização do estro baseado na indução de pseudogestação é uma melhora no desempenho da leitegada de fêmeas primíparas, representado pelo aumento do peso dos leitões ao nascimento e ao desmame (ZAVY et al., 1988; GUTHRIE et al., 1975). O possível embasamento fisiológico por trás desses achados teria relação com o fato de que o período de pseudogestação e, conseqüentemente, a exposição prolongada do endométrio à progesterona antes da primeira cobertura, resultaria no aumento da capacidade secretória uterina acima dos níveis observados para marrãs. De fato, a progesterona estimula a expressão e secreção de várias proteínas que constituem o histotrofo, o qual por sua vez é produzido em sua maior parte pelo epitélio glandular uterino. (BAZER et al., 2011). No presente experimento, as fêmeas submetidas à pseudogestação antes da cobertura apresentaram aumento da área glandular média em comparação as fêmeas do grupo controle. Estudos já demonstraram que a hipertrofia das glândulas uterinas foi acompanhada pelo aumento da expressão de IGF-I, VEGF e aumento do peso de embriões coletados no dia 28 da gestação (MURO et al., 2020; 2021). No entanto, em nosso trabalho, o aumento da área glandular média não foi acompanhado por nenhuma alteração sobre o desenvolvimento embrionário, uma vez que o número de embriões fragmentados não diferiu entre as fêmeas tratadas e controle.

O método de sincronização do estro utilizando no presente experimento apresentou resultados promissores e comparáveis aos de protocolos de sincronização utilizando altrenogest. Porém, é preciso considerar alguns aspectos. O primeiro diz respeito ao aspecto prático do protocolo, uma vez que, com uma única aplicação de Cipionato de Estradiol e duas aplicações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi possível sincronizar o estro com mais de 90% de efetividade. Em contraste, na sincronização do estro com altrenogest, é necessário que o hormônio seja fornecido por via oral e por períodos que podem chegar até 18 dias, aumentando a necessidade de mão de obra. Outro fator a ser considerado é que a sincronização do estro por meio da indução de pseudogestação resulta em um período prolongado de exposição do ambiente uterino à progesterona endógena, o que poderia trazer benefícios à funcionalidade endometrial, resultando em melhor desenvolvimento embrionário/fetal.

Com base nos resultados do presente trabalho, a utilização do protocolo de sincronização do estro por meio da associação de cipionato de estradiol em única aplicação e $\text{PGF}_{2\alpha}$ demonstra ser uma estratégia de manejo reprodutivo promissora, pois apresenta baixo custo, requer menor uso de mão de obra além dos potenciais benefícios que poderia exercer sobre o desenvolvimento embrionário/fetal.

8. CONCLUSÕES

- A aplicação de 10 mg de cipionato de estradiol no dia 12 do ciclo estral foi efetiva em estender a fase luteínica, induzindo pseudogestação;
- As fêmeas pseudogestantes apresentaram estro sincronizado após a indução da luteólise com $\text{PGF}_{2\alpha}$;
- O protocolo de sincronização do estro baseado na indução de pseudogestação com Cipionato de Estradiol e indução da luteólise com $\text{PGF}_{2\alpha}$ não exerceu efeito deletério sobre a fertilidade e o desenvolvimento embrionário;

9. REFERÊNCIAS

ASHWORTH, C.J.; TOMA, L.M.; HUNTER, M.G. Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 364, p. 3351-3361, 2009.

ARCK, P.; HANSEN, P.J.; MULAC, J.B, PICCINNI, M.P.; SZEKERES-BARTHO J. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross-talk in mammalian species and the role of stress. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 58, p. 268-279, 2007.

BASHOUR, M.N.; WRAY, S. Progesterone directly and rapidly inhibits GnRH neuronal activity via progesterone receptor membrane component 1. **Endocrinology**, v. 153, p. 4457-4469, 2012.

BAZER, F. W.; THATCHER, W. W. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F2 α by the uterine endometrium. **Prostaglandins**, v. 14, p. 397-401, 1977.

BAZER, F.W.; WU, G.; SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; BAYLESS, K. Novel pathways for implantation and establishment of pregnancy and maintenance of pregnancy in mammals. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, p. 135-152, 2010.

BAZER, F.W.; JOHNSON, G.A. Pig blastocyst-uterine interactions. **Differentiation**, v.87, p. 52-65, 2014.

BENNETT-STEWARD, K.; ARAMINI, J.; PELLAND, C.; FRIENDSHIP, R. Equine chorionic gonadotrophin and porcine luteinizing hormone to shorten and synchronize the wean-to-breed interval among parity-one and parity-two sows. **Journal of Swine Health and Production**, v.16, p.182–7, 2008.

BRUSVEEN, D.J.; SOUZA, A.H.; WILTBANK, MC. Effects of additional prostaglandin F2 α and estradiol-17 β during Ovsynch in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.1412–1422, 2009

BRUSSOW, K.P.; SCHNEIDER, F.; KANITZW, RATKY, J.; KAUFFOLD, J. WAHNER, M. Studies on fixed-time ovulation induction in the pig. In: RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; VALLET, J.L.; ZIECIK, A.J. **Control of Pig Reproduction VIII**. Nottingham University Press; p.187–95, 2009.

BORTOLOZZO, F.P.; BERNARDI, M.L.; KUMMER, R.; WENTZ, I. Growth body state and breeding performance in gilts and primiparous sows. **Society of reproduction and Fertility supplement**, v. 66, p. 281-291, 2009.

CASTANGNA, D.C.; PEIXOTO, H.C.; BORTOLOZZO, P.F.; WENTZ, I.; NETO, B.G.; RUSCHEL, F. Ovarian cysts and their consequences on the reproductive performance of swine herds. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 115-123, 2004.

CARE, A.S.; DIENER, K.R.; JASPER, M.J.; BROWN, H.M.; INGMAN, W.V.; ROBERTSON, S.A. Macrophages regulate corpus luteum development during embryo implantation in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, p. 3472–3487, 2013.

CUSHMAN, R.A.; DAVIS, P.E.; BOONYAPRAKOB, U.; HEDGPETH, V.S.; BURNS, P.J.; BRITT, J.H. Use of slow-release estradiol and prostaglandin F2 α to induce pseudopregnancy and control estrus in gilts. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 2883-2885, 1999.

CHANG, J.; FRANDBSEN, S.; GADSBY, J.E. Prostaglandin synthesis by the porcine corpus luteum: effect of tumor necrosis factor- α . **Domestic Animal Endocrinology**, v. 58, p. 53-62, 2017.

DA SILVA, C. L. A., VAN DEN BRAND, H., LAURENSEN, B. F. A., BROEKHUIJSE, M. L. W., KNOL, E. F., KEMP, B., SOEDE, N. M. Relationships between ovulation rate and embryonic and placental characteristics in multiparous sows at 35 days of pregnancy. **Animal**, v. 10:7, p. 1192-1199, 2016

DEGENSTEIN, K.L.; O'DONOGHUE, R.; PATTERSON, J.L.; BELTRANENA, E.; AMBROSE, D.J.; FOXCROFT, G.R.; DYCK, M.K. Synchronization of ovulation in cyclic gilts with porcine luteinizing hormone (pLH) and its effects on reproductive function. **Theriogenology**, v. 70, p-1075-1085, 2008.

DRIANCOURT, M.A.; COX, P. RUBION, S.; HARNOIS-MILON, G.; KEMP, B.; SOEDE, N.M. Induction of an lh surge and ovulation by busserelin (as receptal) allows breeding of weaned sows with a single fixed-time insemination. **Theriogenology**, v. 80, p. 391–399, 2013.

DEGENSTEIN, K.L.; O'DONOGHUE, R.; PATTERSON, J.L.; BELTRANENA, E.; AMBROSE, D.J.; FOXCROFT, G.R.; DYCK, M.K. Synchronization of ovulation in cyclic gilts with porcine luteinizing hormone (pLH) and its effects on reproductive function. **Theriogenology**, v.70, p. 1075-85, 2008.

DE RENSIS, F.; SALERI, R.; TUMMARUK, P.; TECHAKUMPHU, M.; KIRKWOOD, R.N. Prostaglandin F2 α and control of reproduction in female swine: a review. **Theriogenology**, v. 77, p. 1-11, 2012.

ESTIENNE, M.J.; HARPER, B.R.; HORSLEY, C.E.; ESTIENNE C.E.; KNIGHT, J.W. Effects of P.G. 600 on the onset of estrus and ovulation rate in gilts treated with Regumate. **Journal of Animal Science**, v. 79, p.2757-2761, 2001.

ER, E.; OLIVER, L.; CARTRON, P.F.; JUIN, P.; MANON, S.; VALLETTE, F.M. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, p. 301–1311, 2006.

FLOWERS, B.; CANTLEY, T.C.; MARTIN, M.J.; DAY, B.N. Episodic secretion of gonadotrophins and ovarian steroids in jugular and utero-ovarian vein plasma during the follicular phase of the oestrous cycle in gilts. **Journal of Reproduction and Fertility**. 91, 101–112, 1991.

FRANCZACK, A.; KOTWICA, G. Secretion of estradiol-17 β by porcine endometrium and myometrium during early pregnancy and luteolysis. **Theriogenology**, v.69, p.283-289, 2008.

FREKING, B.A.; LENTS, C.A.; VALLET. Selection for uterine capacity improves lifetime productivity in sows. **Animal Reproduction Science**, v. 167, p. 16-21, 2016.

FOXCROFT, G.R.; VINSKY M.D.; PARADIS, F.; SEE, W.Y.; TOWN, S.C.; PUTMAN, C.T.; DYCK, M.K.; DIXON, W.T. Macroenvironment effects on oocytes and embryos in swine. **Theriogenology** v. 68, p. 30–39, 2007.

GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T.; WETTEMANN, R.P.; BIGGERS, B.G. Length of pseudopregnancy and pattern of uterine protein release as influenced by time and duration of oestrogen administration in the pig. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 79, p. 163-172, 1987.

GADSBY, J. E.; SMITH, C.A.; ALMOND, G.W. 1991. Acute stimulatory effects of prostaglandin F2 α on serum progesterone concentrations in pregnant and pseudopregnant pigs. **Prostaglandins**, v.41, p. 419-432, 1991.

GORDON, I. 1997. Controlled Reproduction in Pigs. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

GUTHRIE, H.D. Estrous synchronization and fertility in gilts treated with estradiol benzoate and prostaglandin F2 α . **Theriogenology**, v. 4, p. 69-75, 1995.

GUTHRIE, H.D. The follicular phase in pigs: follicle populations, circulating hormones, follicle factors and oocytes. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 79–89, 2005.

HAZELEGER, W.; KIRKWOOD, R.; SOEDE, N. Synchronization of the reproductive cycle in pigs. **Archiv Tierzucht**, v. 44, p. 71-76, 2001.

HIRAYAMA, Y.; YOSHIOKA, K.; NOGUCHI, M.; MISUMI, K. Embryo collection from pigs post-pseudopregnancy induced by estradiol dipropionate. **Animal Science Journal**, v. 00, p. 1-7, 2019.

HUHN, U.; JOCHLE, W.; BRUSSOW, K.P. Techniques developed for the control of estrus, ovulation and parturition in the East German pig industry: a review. **Theriogenology**, v. 46, p. 911–24, 1996.

HOGUE, M. D.; BATES, R. O. Developmental factors that influence sow longevity. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1238–1245, 2010.

HORSLEY, B.R.; ESTIENNE, M.J.; HARPER, A.F.; PURCELL, S.H.; BAITIS, H.K.; BEAL, W.E.; KNIGHT, J.W. Effect of P.G. 600 on the timing of ovulation in gilts treated with altrenogest. **Journal of Animal Science**. v.83, p.1690-1695, 2005.

KA, H.; SEO, H.; CHOI, Y.; YOO, I.; HAN, J. Endometrial response to conceptus-derived estrogen and interleukin-1 β at the time of implantation in pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 9, p. 44, 2018.

KASSI, E.; MOUTSATSOU, P. Estrogen Receptor Signaling and Its Relationship to Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-14, 2010.

KRAELING, R. R.; RAMPACEK, G.B. Synchronization of estrus and ovulation in gilts with estradiol and prostaglandin F2 α . **Theriogenology**. v.8, p.103–110, 1977.

KRAELING, R.R.; WEBEL, S. Current strategies for reproductive management of gilts and sows in North America. **Journal of Animal Science and Biotechnology**. v.6, p.1-14, 2015.

KNOX, R.V.; VATZIAS, G.; NABER, C.H.; ZIMMERMAN, D.R. Plasma gonadotropins and ovarian hormones during the estrous cycle in high compared to low ovulation rate gilts. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 249–260, 2003.

KNOX, R.V. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. **Domestic Animal Endocrinology**, 29, 385–397, 2005.

LUCY, M.C.; LIU, J.; BOYD, K.; BRACKEN, C.J. Ovarian follicular growth in sows. **Reproduction**, v. 58, p. 31–45, 2001.

MARQUES, M.G.; DE SOUZA, A.; PANDOLFI, J.R.C. Metodologia para coleta *in vitro* de embriões em suínos. **Comunicado Técnico, Embrapa**, v. 570, p. 1-5, 2019.

MARTINAT-BOTTÉ, F.; BARITEAU, F.; FORGERIT, Y.; MACAR, C.; POIRIER, P.; TERQUI, M. Synchronization of oestrus in gilts with Altrenogest: effects on ovulation rate and foetal survival. **Animal Reproduction Science**. v. 39, p.267–274, 1995.

MARTINAT-BOTTÉ, F.; BARITEAU, F.; FORGERIT, Y.; MACAR, C.; POIRIER, P.; TERQUI, M. Control of reproduction with a progestagen - Altrenogest (Regumate) in gilts and at weaning in Primiparous sows: effect on fertility and litter size. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 29, p.362–365, 2010.

MARTÍNEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; BÓ, G.A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**. v.86, p.37-52, 2005.

MCCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**. v.79, p.263-323, 1999.

MCPHERSON, R.L.; JI, F.; WU, G., BLANTON, J.R.; KIM, S.W. Growth and compositional changes of fetal tissues in pigs. **Journal of Animal Science**, p. 82, p. 2534–2540, 2004.

MURO, B.B.D.; CARNEVALE, R.F., LEAL, D.F., TORRES, M.A., MENDONÇA, M.V.; NAKASONE, D.H.; MARTINEZ, C.H.G.; RAVAGNANI, G.M.; MONTEIRO, M.S.; POOR, A.P.; VIAU, P.; OLIVEIRA, C.A.; PULZ, L.H.; STREFEZZI, R.F.; ALMOND, G.W.; DE ANDRADE, A.F.C. Supplemental progesterone during early pregnancy exerts divergent responses on embryonic characteristics in sows and gilts. **Animal**, v. 14, p. 1234-40, 2020.

NOGUCHI, M.; YOSHIOKA, K.; ITOH, S.; SUZUKI, C.; ARAI, S.; WADA, Y.; HASEGAWA, Y.; KANEKO, H. Peripheral concentrations of inhibin A, ovarian steroids, and gonadotropins associated with follicular development throughout the estrous cycle of the sow. **Reproduction**, v. 139, p. 153–161, 2010.

NOGUCHI, M.; YOSHIOKA, K.; SUZUKI, C.; ARAI, S.; ITOH, S.; WADA, Y. Estrus synchronization with pseudopregnant gilts induced by a single treatment of estradiol dipropionate. **Journal of Reproduction and Development**. v.56, p.421-427, 2010.

NOGUCHI, M.; YOSHIOKA, K.; SUZUKI, C.; ITOH, S.; KANEKO. An efficient protocol for inducing pseudopregnancy using estradiol dipropionate and follicular development associated with changes in reproductive hormones after prostaglandin F₂α treatment in pseudopregnant sows. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, p. 157. 2011.

NOGUCHI, M.; KASHIWAI, S.; ITOH, S.; OKUMURA, H.; KURE, K.; SUZUKI, C.; YOSHIOKA, K. Reproductive hormone profiles in sows on estrus synchronization using estradiol dipropionate and prostaglandin F₂α-analogue and the reproductive performance in female pigs on commercial farms. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, p. 343–348. 2013.

ORIOWO, M.A.; LANDGREEN, B.M.; STENSTRON, B.; DICZFALUSY, E. A comparison of the pharmacokinetic properties of three estradiol esters. **Contraception**. v. 21, p.415-424, 1980.

PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.; SOBIN, L.H. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1992. 279 p.

PUSATERI, A.E.; WILSON, M.E.; DIEKMAN, M.A. Maternal recognition of pregnancy in swine. II. Plasma concentrations of progesterone and 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin F₂α during the estrous cycle and during short and long pseudopregnancy in gilts. **Biology of Reproduction**. v.55, p.590–597, 1996.

QUESNEL, H.; ETIENNE, M.; PERE, M. C. Influence of litter size on metabolic status and reproductive axis in primiparous sows. **Journal of Animal Science**. v.85, p.118–128, 2007.

SKARZYNSK, D.J.; PIOTROWSKA-TOMALA, K.K.; LUKASIK, K.; GALVÃO, A.; FARBEROV, S.; ZALMAN, Y.; MEIDAN, R. Growth and Regression in Bovine Corpora Lutea: Regulation by Local Survival and Death Pathways. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 25-37, 2013.

SOEDE, M.N.; HELMOND, F.A.; KEMP, B. Perioovulatory profiles oestradiol, LH and progesterone in relation to oestrus and embryo mortality in multiparous sows using transrectal ultrasonography to detect ovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 101, p. 633-41, 1994.

SOEDE, N.M.; WETZELS, C.C.H.; ZONDAG, W.; DE KONING, M.A.; KEMP B. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 99–106, 1995.

SOEDE, N.M.; KEMP, B. Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement**.1997; v. 52, p. 91-103, 1997.

SOEDE, N.M.; LANGENDIJK, P.; KEMP, B. Reproductive cycles in pigs. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 251-258, 2011.

SONG, G.; DUNLAP, K.A.; KIM, J.; BAILEY, D.W.; SPENCER, T.E.; BURGHARDT, R.C.; WAGNER, G.F.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W. Stanniocalcin 1 is a luminal epithelial marker for implantation in pigs regulated by progesterone and estradiol. **Endocrinology**. v. 150, p. 936-945, 2009.

STOCCO, C.O.; LAU, L.F.; GIBORI G. A calcium/calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20 α -hsd genes by prostaglandin F₂ α in ovarian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 3293–3302, 2002.

SUGINO, N.; OKUDA, K. Growth and Regression in Bovine Corpora Lutea: Regulation by Local Survival and Death Pathways. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, 977-986, 2007.

THINGNES, S.L; HALLENSTVEDT, E.; SANDBERG, E.; FRAMSTAD, T. The effect of different dietary energy levels during rearing and mid-gestation on gilt performance and culling rate. **Livestock Science**. v.172, p. 33-42, 2015.

VYNCKIER, L.; DEBACKERE, M.; DE KRUIF, A.; CORYN, M. Plasma estradiol-17 β concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 β benzoate and estradiol-17 β PSGionate –a preliminary study. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics** . v.13, p.36–42. 1990.

WACLAWICK, A. Novel insights into the mechanisms of pregnancy establishment: regulation of prostaglandin synthesis and signaling in the pig. **Reproduction**. v.142, p.389-399, 2011.

WEBEL, S. K.; DAY, B.N. The control of ovulation. In: COLE, D.J.; FOXCROFT, G.R. (ed.) **Control of Pig Reproduction**. p.197–210. Butterworths, London.

WEITZE, K.F.; WAGNER-RIETSCHER, H.; WABERSKI, D.; RICHTER, L.; KRIETER, J. The onset of heat after weaning, heat duration, and ovulation as major factors in IA timing in sows. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 29, n. 7, p. 433-43, 1994.

WU R., VAN DER HOEK, K.H.; RYAN, N.K.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R.L. Macrophage contributions to ovarian function. **Human Reproduction Update**, v. 10, p. 119–133, 2004.

ZAVY, M.T.; GEISERT, R.D.; BUCHANAN, D.S.; NORTON, S.A. Estrogen-induced pseudopregnancy in gilts: its use in estrus synchronization and subsequent influence on litter response. **Theriogenology**. v. 30, p. 721-732, 1988.

ZHAO Y.; BURBACH J.A.; ROBY, K.F.; TERRANOVA, P.F.; BRANNIAN, J.D. Macrophages are the major source of tumor necrosis factor α in the porcine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1385–1391, 1998.

XIE, S.; BROERMANN, D.M.; NEPHEW, K.P.; BISHOP, M.D.; POPE, W.F. Relationship between oocyte maturation and fertilization on zygotic diversity in swine. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 2027–2033, 1990.

ZAK L.J.; XU X.; HARDIN R.T.; FOXCROFT, G.R. Impact of different patterns of feed intake during lactation in the primiparous sow on follicular development and oocyte maturation. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 110, p. 99–106, 1997

ZORRILLA, L.M.; D'ANNIBALE, M.A.; SWING, S.E.; GADSBY, J.E. Expression of Genes Associated with Apoptosis in the Porcine Corpus Luteum During the Oestrous Cycle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 755-761, 2013.