

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Efeito do tratamento com gonadotrofinas sobre o trato reprodutivo e ciclo
estral de leitoas**

Camila Ribeiro Carvalho de Brito

Pelotas, 2023

Camila Ribeiro Carvalho de Brito

**Efeito do tratamento com gonadotrofinas sobre o trato reprodutivo e ciclo
estral de leitoas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Thomaz Lucia Junior

Co-orientadores: Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin

Prof. Dr. Rafael Gianella Mondadori

Prof. Dr Ivan Bianchi

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

B862e Brito, Camila Ribeiro Carvalho de

Efeito do tratamento com gonadotrofinas sobre o trato reprodutivo e ciclo estral de leitoas [recurso eletrônico] / Camila Ribeiro Carvalho de Brito ; Thomaz Lucia Junior, orientador ; Bernardo Garziera Gasperin, Rafael Gianella Mondadori, Ivan Bianchi, coorientadores. — Pelotas, 2023.

63 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Gonadotrofinas exógenas. 2. Leitoas. 3. Ciclo Estral. 4. Tuba Uterina. 5. Suinocultura. I. Lucia Junior, Thomaz, orient. II. Gasperin, Bernardo Garziera, coorient. III. Mondadori, Rafael Gianella, coorient. IV. Bianchi, Ivan, coorient. V. Título.

CDD 636.40824

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Camila Ribeiro Carvalho de Brito

Efeito do tratamento com gonadotrofinas sobre o trato reprodutivo e ciclo estral de
leitoas

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade
Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 22/02/2023

Banca examinadora:

Prof. Dr. Thomaz Lucia Junior (Orientador)
Doutor em Veterinary Medicine por University of Minnesota

Profa. Dra. Ana Paula Gonçalves Mellagi
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. André Furugen César de Andrade
Doutor em Reprodução Animal pela Universidade de São Paulo

Dra. Mariana Groke Marques
Doutora em Reprodução Animal pela Universidade de São Paulo

Eu dedico essa tese à minha mãe, à minha avó e ao meu irmão

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente e acima de tudo, à minha família, que sempre esteve ao meu lado nos momentos felizes e nos mais desafiadores. À minha mãe, Cyntia, que me deu a vida e me ensinou a ser prudente nas minhas decisões — obrigada por me guiar com valores éticos tão sólidos. Te amo profundamente. À minha vizinha Luiza, que me ensinou a ler e cuidou de mim com tanto carinho enquanto minha mãe trabalhava — agradeço ao destino por tê-la feito minha avó. Te amo com todo o coração. Ao meu irmão, Guilherme, que, apesar das nossas diferenças, me ensinou sobre tolerância — te amo do fundo da alma. Agradeço ainda aos meus tios, tanto paternos quanto maternos, que sempre torceram por mim e me acompanharam com carinho ao longo dessa jornada.

Aos meus mentores do antigo Repropel, agora Fibra — professores Arnaldo Diniz, Rafael Mondadori, Bernardo Gasperin e, em especial, ao meu orientador Thomaz Lucia — deixo meu sincero agradecimento por terem contribuído imensamente para o amadurecimento do meu pensamento crítico e por me ensinarem tanto sobre ciência, paciência e persistência. Aos professores Ivan Bianchi e Rafael Ulguim, minha gratidão pelo apoio acadêmico e pelas discussões sempre enriquecedoras sobre reprodução suína — vocês são incríveis!

Aos colegas de trabalho da empresa Pamplona Alimentos S.A., meu muito obrigada. Em especial, à Médica Veterinária Pricila Baldessar, companheira de experimento, que me deu suporte material e emocional em grande parte deste trabalho. Agradeço profundamente por ter confiado em mim e por ter me oferecido minha primeira oportunidade na suinocultura. À Sheila Souza, obrigada por ter me acolhido com tanto carinho em Rio do Sul e por nossa amizade construída em tão pouco tempo, mas tão significativa. Meninas, sou imensamente grata a vocês!

Aos colegas e amigos da pós-graduação, obrigada pela parceria, pelo companheirismo e pelos momentos de desabafo, especialmente em tempos pandêmicos. A amizade de vocês foi essencial para manter minha sanidade e seguir em frente.

To the person that came into my life not long ago, Matthew — thank you for being such an amazing partner and friend. Your love and support gave me the stability I needed to reach this point and finish writing my thesis. Love you with all my heart.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária pela oportunidade e pela estrutura oferecida. Que os próximos anos tragam mais apoio e financiamento para que a pesquisa acadêmica possa ser realizada com excelência. Que a universidade pública continue sendo gratuita e de qualidade, e que, apesar das dificuldades enfrentadas nos últimos anos, siga sendo um importante catalisador de transformação social — como foi para mim.

“Sucesso não é o final, falhar não é fatal: é a coragem para continuar que conta.”

Winston Churchill.

Resumo

DE BRITO, Camila Ribeiro Carvalho. **Efeito do tratamento com gonadotrofinas sobre o trato reprodutivo e ciclo estral de leitoas**. 2023. 63f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

O início precoce e eficiente da puberdade em leitoas é fundamental para garantir sua longevidade reprodutiva e produtividade dentro dos sistemas de produção. A maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, mediada pela ação de hormônios como o GnRH, LH e FSH, depende da ativação de vias neuroendócrinas, como a do sistema kisspeptina/GPR54. A falha em atingir a puberdade, comum em até 30% das leitoas, pode estar associada a fatores neurobiológicos e ambientais, impactando negativamente os índices zootécnicos. O ciclo estral das porcas, com duração média de 21 dias, é regulado por mudanças hormonais e estruturais nos ovários, sendo dividido em fases folicular e luteal. Frente às dificuldades de sincronização natural do estro, o uso de hormônios exógenos, como progestágenos, estrógenos e gonadotrofinas, tem se mostrado uma ferramenta valiosa na organização reprodutiva e manejo das granjas, sobretudo em sistemas de produção baseados em manejo em bandas. A escolha e aplicação adequada desses protocolos hormonais contribuem para a otimização dos recursos, previsibilidade produtiva e melhoria dos indicadores reprodutivos. No presente trabalho, em dois experimentos distintos fêmeas púberes receberam dois tratamentos com gonadotropinas exógenas. No primeiro duas doses de 1500 UI de hCG em D12 e D15, seguido pela aplicação de cloprostenol sódico no D25 e no D30. No segundo, as fêmeas receberam eCG no D10 e hCG no D12 e duas doses de hCG como no experimento anterior, com o cloprostenol aplicado apenas no D30. A injeção de cloprostenol sódico D30 foi capaz de reduzir a concentração de progesterona e concentrar a apresentação de estro da maioria das fêmeas em até 6 dias de sua aplicação. Entretanto, no segundo experimento, o grupo que recebeu as duas doses de hCG apresentou uma redução significativa do número de leitões em relação aos grupos controle e eCG e hCG. Por último, fêmeas pré-púberes receberam tratamento hormonal com gonadotrofinas para mimetizar diferentes fases do ciclo estral, sendo um dos grupos inseminados. Nessas fêmeas foi feita a avaliação morfométrica dos ovidutos nos diferentes grupos. Não houve diferenças significativas entre os grupos nas medidas das porções das tubas uterinas avaliadas.

Palavras-chave: Gonadotrofinas Exógenas; Leitoas; Ciclo Estral; Tuba Uterina; Suinocultura.

Abstract

DE BRITO, Camila Ribeiro Carvalho. **The effect of gonadotrophin treatment on the reproductive tract and estrous cycle of gilts.** 2023. 63f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

The early and efficient onset of puberty in gilts is essential to ensure their reproductive longevity and productivity within production systems. The maturation of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis, mediated by the action of hormones such as GnRH, LH, and FSH, depends on the activation of neuroendocrine pathways, including the kisspeptin/GPR54 system. Failure to reach puberty, which occurs in up to 30% of gilts, may be associated with neurobiological and environmental factors, negatively impacting reproductive performance. The estrous cycle in sows, with an average duration of 21 days, is regulated by hormonal and structural changes in the ovaries and is divided into follicular and luteal phases. Given the challenges of natural estrus synchronization, the use of exogenous hormones—such as progestagens, estrogens, and gonadotropins—has proven to be a valuable tool for reproductive organization and herd management, particularly in production systems based on batch management. The proper selection and application of these hormonal protocols contribute to resource optimization, production predictability, and improved reproductive indicators. In the present study, two separate experiments were conducted in pubertal females treated with exogenous gonadotropins. In the first, two doses of 1500 IU of hCG were administered on days 12 and 15, followed by the application of sodium cloprostenol on days 25 and 30. In the second experiment, females received eCG on day 10, hCG on day 12, and two additional doses of hCG as in the previous experiment, with cloprostenol administered only on day 30. The injection of sodium cloprostenol on day 30 was able to reduce progesterone concentrations and concentrate estrus expression in most females within six days after administration. However, in the second experiment, the group that received the two doses of hCG showed a significant reduction in litter size compared to the control and eCG + hCG groups. Lastly, prepubertal females were hormonally treated with gonadotropins to mimic different phases of the estrous cycle, with one group being inseminated. In these females, a morphometric evaluation of the oviducts was performed across the different groups. No significant differences were observed between groups in the measurements of the uterine tube segments evaluated.

Keywords: Gilts; Exogenous Gonadotropins; Pig Farming; Estrous-cycle; Uterine tube.

Lista de Figuras

Artigo 1

- Fig. 1 Experimental design of Experiment I (n = 6 gilts per group)*
 *PGF25: administration of two doses (250 µg each) of a Prostaglandin F2α analogue (PGF) within a 6-h interval, in the 25th d after the day of the third estrus (D0). PGF30: administration of two doses (250 µg each) of a Prostaglandin F2α analogue (PGF) within a 6-h interval, in the 30th d after the day of the third estrus (D0)..... 36
- Fig. 2 Experimental design of Experiment II (n = 12 gilts per group)*
 *eCG+hCG: 400 UI eCG at D10 plus 500 UI hCG at D12; hCG2: two hCG doses (1500 UI each) at D12 and D15. In both such groups, gilts that did not exhibit estrus until the 30th d after the day of the third estrus (D0) received two doses (250 µg each) of a Prostaglandin F2α analogue (PGF) within a 6-h interval, in the D30. AI: intracervical artificial insemination at 24-h intervals after estrus detection (up to 3 AI, depending on the estrus duration)..... 37
- Fig. 3 Period until the expression of the fourth estrus for gilts treated with two hCG doses (1500 UI each) at the 12th and at the 15th d after the third estrus plus two doses of a Prostaglandin F2α (PGF) analogue (250 µg each) at a 6-h interval in distinct periods - Experiment I*
 *PGF25: administration in the 25th d after the third estrus
 PGF30: administration in the 30th d after the third estrus.
 A,BMeans ± SEM with distinct superscripts differ by P = 0.0003..... 38
- Figure 4 . Serum progesterone concentration in gilts treated with two hCG doses (1500 UI each) at the 12th and at the 15th d after the third 39

estrus plus two doses of a Prostaglandin F2 α (PGF) analogue (250 μ g each) at a 6-h interval in distinct periods – Experiment I*

*PGF25: administration in the 25th d after the third estrus

PGF30: administration in the 30th d after the third estrus.

^{A,B,C}Distinct superscripts indicate significant differences (P=0.011).....

Figure 5 Distribution of estrus expression in gilts per treatment - Experiment II*

*Control: no treatment; eCG+hCG: 400 UI of eCG at D10 plus 500 UI of hCG at D12; hCG2: two doses of 1500 UI hCG at D12 and D15 (n = 12 gilts per group)..... 40

Figure 6 Serum progesterone concentration per treatment considering the day of the first detected estrus as D0 - Experiment II*

*Control: no treatment; eCG hCG: 400 UI of eCG at D10 plus 500 UI of hCG at D12; hCG2: two doses of 1500 UI hCG at D12 and D15..... 41

Artigo 2

Figure 1 Experimental design: D0 = day of slaughter; AI = artificial insemination 51

Figura 2 Serum estradiol (A) and progesterone (B) concentrations in prepubertal gilts receiving distinct treatments. Control: No treatment; eCG: 1200 IU eCG on D3; eCG+hCG: 1200 IU eCG on D6 plus 500 IU hCG on D3; eCG+hCG+AI: 1200 IU eCG on D6 plus 500 IU hCG on D3 plus artificial insemination on D1 (D0=day of slaughter). ^{a,b}Means $\pm$ SEM differ by at least p<0.001..... 52

Figure 3 Representative morphometric images of the ampulla of the oviducts. Histological section stained with haematoxylin and eosin, assessed using a 40 $\times$ objective (A): Red arrow indicates internal diameter; green arrow represents the external diameter. Epithelial (B) and smooth muscle (C) areas assessed using the threshold tool of ImageJ. 53

Lista de Tabelas

Artigo 1

Table 1	Serum progesterone concentration after the day of their first detected estrus (D0) in gilts submitted to gonadotrophin treatment - Experiment II*	
	*Control: no treatment; eCG+hCG: 400 UI of eCG at D10 plus 500 UI of hCG at D12; hCG2: two hCG doses (1500 UI each) at D12 and D15	
	A,B,CMeans $\pm$ SEM with distinct superscripts differ by at least $P < 0.001$	42
Table 2	Inter-estrus interval, farrowing rate and total litter size in the first gestation for gilts submitted to gonadotrophin treatment - Experiment II*	
	*Control: no treatment; eCG+hCG: 400 UI of eCG at D10 plus 500 UI of hCG at D12; hCG2: two hCG doses (1500 UI each) at D12 and D15.	
	A,B,CMeans $\pm$ SEM differ by at least $P < 0.0001$	
	X,YMeans $\pm$ SEM differ by $P = 0.018$	43

Artigo 2

Table 1	Morphometric data of ampulla of oviducts of prepubertal gilts receiving distinct treatments.....	54
---------	--	----

Sumário

1 Introdução.....	13
1.1 O ciclo estral em fêmeas suínas.....	15
1.2 Uso de hormônios na indução e controle do ciclo estral em fêmeas suínas na organização de manejos.....	17
1.2.1 Progestágenos.....	18
1.2.2 Estrógenos.....	20
1.2.3 Gonadotrofinas.....	21
2 Objetivos.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 Artigos.....	24
3.1 Artigo 1.....	24
3.2 Artigo 2.....	44
4 Considerações Finais.....	55
Referências.....	56
Anexos.....	62

1 Introdução

O sucesso dos programas de reprodução suína começa com a seleção criteriosa de fêmeas com maior potencial reprodutivo – aquelas capazes de produzir grandes leitegadas ao parto e, posteriormente, desmamar um alto número de leitões saudáveis, com peso e idade adequados. No entanto, antes que esses resultados possam ser alcançados, é essencial que as leitoas atinjam a puberdade precocemente, um fator-chave para maximizar sua longevidade reprodutiva e produtividade dentro do rebanho (PATTERSON; FOXCROFT, 2019).

A puberdade em fêmeas é definida como a idade na qual ocorre o primeiro estro ou a primeira ovulação. Trata-se de um evento fisiológico regulado tanto pelo sistema nervoso central quanto pelos ovários. O eixo hipotálamico-hipofisário-gonadal (HHG) inicia sua comunicação já entre os dias 80 a 100 de gestação. Entre os 60 e 90 dias de idade, os ovários das leitoas apresentam folículos terciários (LENTS et al., 2020). Esses folículos são capazes de secretar estradiol, estabelecendo o feedback positivo no hipotálamo e, assim, desencadeando o início da puberdade (FOXCROFT et al., 1984).

Em geral, cerca de 30% das leitoas não atingem a puberdade e são descartadas dos rebanhos, apesar de apresentarem idade e peso corporal adequados (WIJESENA et al., 2023). O atraso na manifestação do estro pode ocorrer devido ao subdesenvolvimento do sistema reprodutor (anestro pré-puberal) ou a uma ovulação silenciosa (anestro comportamental), em que a fêmea não apresenta os sinais típicos da fase do estro (como a imobilidade reflexa, edema de vulva, entre outros) (WIJESENA et al., 2024). Em fêmeas com anatomia reprodutiva normal e condição corporal adequada, a falha em iniciar a puberdade tem sido atribuída a disfunções em regiões neuroanatômicas específicas envolvidas na regulação da puberdade. Estudos sugerem que a expressão diferencial de genes relacionados ao sistema GABAérgico na amígdala e no hipocampo está associada à ausência de estro em leitoas descartadas por anestro pré-puberal ou comportamental (WIJESENA et al., 2024). A amígdala e o hipocampo participam do processamento de estímulos emocionais, sociais e motivacionais, sendo essenciais para a coordenação de comportamentos instintivos como reprodução, agressividade e autopreservação (WIJESENA et al.,

2024). Enquanto a amígdala e o hipocampo processam estímulos sensoriais e emocionais relevantes para o comportamento reprodutivo, o hipotálamo atua como o principal centro integrador, traduzindo esses sinais neurais em estímulos endócrinos que governam o início da puberdade e a função reprodutiva (FONG; ZHENG; KURRASCH, 2023). Ele exerce um papel central na regulação da fisiologia reprodutiva por meio do controle do eixo HHG. Um grupo específico de neurônios localizado no hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que é o principal sinal neuroendócrino responsável por iniciar a função reprodutiva (LENTS et al., 2020). Esses neurônios são essenciais para o início e a manutenção da ciclicidade estral em fêmeas mamíferas.

A dinâmica do eixo HPG pode ser resumida na secreção de GnRH, responsável por induzir o pico de LH, que, por sua vez, culmina na ovulação. Pesquisas recentes em diversas espécies de mamíferos indicam que o iniciador dessa dinâmica é o sistema Kisspeptina-GPR54 (TOMIKAWA et al., 2010). O gene Kiss1 é amplamente expresso em diferentes tecidos, mas sua presença no hipotálamo é essencial para o início da puberdade e o controle do ciclo reprodutivo (LENTS, 2019). Em suínos geneticamente modificados para não expressarem o receptor da kisspeptina, observou-se um fenótipo de hipogonadismo, semelhante ao de pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico (LENTS et al., 2020). A kisspeptina é um pré-pró-hormônio que, ao ser clivado, origina uma série de peptídeos de 10 a 54 aminoácidos que se ligam ao receptor KISS1R nos neurônios produtores de GnRH (SKORUPSKAITE; GEORGE; ANDERSON, 2014). A presença de mRNA de kisspeptina foi identificada no hipotálamo basal medial de leitoas e ao longo do núcleo arqueado dos suínos (TOMIKAWA et al., 2010). Os neurônios de kisspeptina expressam receptores de estrogênio, enquanto os neurônios de GnRH não o expressam; no entanto, a proximidade entre essas populações neuronais e a presença dos receptores indicam que a kisspeptina regula a liberação pulsátil de GnRH (TOMIKAWA et al., 2010). Essa liberação pulsátil é essencial para estimular a hipófise anterior a secretar LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo-estimulante), os quais regulam o desenvolvimento folicular, a produção de estradiol e a ovulação. Os pulsos rítmicos de GnRH são fundamentais para o progresso do ciclo estral, que em porcas geralmente dura de 18 a 24 dias (SOEDE; LANGENDIJK; KEMP, 2011).

1.1 O ciclo estral em fêmeas suínas

Como mencionado anteriormente, o ciclo estral em porcas possui duração média de 21 dias e é dividido em duas fases funcionais: a fase folicular, que dura aproximadamente 5 a 7 dias, e a fase luteal, com duração de 13 a 15 dias (SOEDE; LANGENDIJK; KEMP, 2011). Cada uma dessas fases é definida pela predominância de determinadas estruturas ovarianas e hormônios circulantes. Durante a fase folicular, os principais componentes ovarianos são os folículos em desenvolvimento, sendo o estrogênio o hormônio dominante (SENGER, 2015). Já na fase luteal, observam-se predominantemente os corpos lúteos, com progesterona como o principal hormônio circulante (SENGER, 2015).

A fase folicular vai se iniciar a partir da luteólise do corpo lúteo. Como trata-se de espécie multiovulatória, nos suínos haverá a lise de corpos lúteos (SENGER, 2015). Ela compreende as fases de proestro e estro. Essa fase dura entre quatro e seis dias e se inicia com o recrutamento de folículos antrais de maior tamanho, geralmente entre 2 e 4 centímetros de diâmetro (SOEDE; LANGENDIJK; KEMP, 2011). Concentrações mais altas de progesterona (P4) inibem a secreção de GnRH. Como as concentrações de P4 nessa fase estão decrescentes, ocorre a liberação de GnRH do hipotálamo em altas frequências e amplitudes (SENGER, 2015). Como consequência da liberação de GnRH, são secretados os hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH) pela região anterior da hipófise (SOEDE; LANGENDIJK; KEMP, 2011). Essa fase do ciclo folicular também é conhecida como Proestro e ocorre mediante a queda dos níveis de progesterona e crescimento dos níveis de secreção de estradiol (E2). Quando a secreção de E2 atinge o máximo, ocorre um mecanismo de feedback negativo no hipotálamo que vai ocasionar a liberação do pico de LH pela hipófise (SENGER, 2015). É nesse momento que ocorre a ovulação e, portanto, o estro; momento em que fêmea começa a apresentar comportamentos de receptividade sexual do macho. Toda a fase folicular corresponde a somente 20% do ciclo estral de uma fêmea.

É no início da fase folicular que o pool de folículos antrais que se desenvolveu durante a fase de diestro começa a ser recrutado (SOEDE; LANGENDIJK; KEMP, 2011). Nesse momento, há uma mudança do padrão de secreção de GnRH e FSH de uma frequência menor e amplitude maior, para frequência maior e amplitude menor. O FSH será o hormônio responsável por recrutar folículos imaturos e promover seu

crescimento. Células da granulosa que expressam receptores de FSH, vão promover a síntese de aromatase, convertendo a testosterona produzida nas células da teca em estradiol (ORLOWSKI; SARAO, 2025).

O término da fase folicular se apresenta, primeiramente, quando os folículos pré-ovulatórios começam a expressar receptores de LH nas células da granulosa (SENGER, 2015). A produção de estradiol se encontra em níveis máximos, induzindo um feedback positivo para a liberação de LH. Nesse momento, a fêmea começa a apresentar o comportamento sexual receptivo ao macho, que em suínos se reflete em uma postura imóvel, elevação das orelhas, e aumento de tamanho e hiperemia vulvar (SOEDE; LANGENDIJK; KEMP, 2011). Os oócitos são liberados e captados pela região ampular da tuba uterina e vão por lá permanecer até o encontro com os espermatozóides. Na espécie suína, podem ser liberados entre 15 a 30 oócitos em um único período estral (SOEDE; LANGENDIJK; KEMP, 2011).

Após a ovulação, têm-se o início da fase luteal. Os folículos de onde saíram os oócitos começam uma etapa de reorganização tecidual marcada principalmente por uma intensa remodelação vascular (SOEDE; LANGENDIJK; KEMP, 2011). Fatores angiogênicos como VEGF influenciam na formação dos corpos lúteos. As células da teca remanescentes do folículo rompido se hipertrofiam e há um rearranjo das camadas de células da granulosa, que se tornam mais soltas (MURPHY et al., 2001), não havendo mais separação entre as células da granulosa e da teca. Há uma intensa proliferação de células da teca, granulosa e vascularização. A mistura dos tipos celulares vai gerar dois distintos grupos de células luteais: células lúteas grandes, originadas das células da granulosa, e células lúteas pequenas, originadas das células da teca (SENGER, 2015). A mistura dessas células vai promover a secreção de progesterona, a partir da conversão de colesterol em pregnenolona pela enzima P450scc e em pregnenolona em P4 pela 3β -HSD (MURPHY et al., 2001). Esse início da formação dos corpos lúteos e da secreção de progesterona constitui a fase de metaestro, que dura entre 2 e 4 dias. Quando os corpos lúteos já se encontram no máximo do seu amadurecimento e no pico de produção de progesterona, o ciclo estral é chamado de diestro, que corresponde a fase mais duradoura do ciclo (entre 5 a 18 dias). Os corpos lúteos atingem o tamanho máximo cerca de uma semana após a ovulação e costumam pesar juntos de 6 a 10 g (SOEDE; LANGENDIJK; KEMP, 2011). Durante a fase luteal o padrão de secreção de LH costuma ser de baixa frequência e

grande amplitude e parece ser importante para secreção de progesterona durante a gestação (SOEDE; LANGENDIJK; KEMP, 2011).

A fase luteal chega ao fim ao redor do dia 15 após a ovulação, causada pela secreção de prostaglandinas uterinas ($\text{PGF2}\alpha$) (SOEDE; LANGENDIJK; KEMP, 2011). Corpos lúteos são sensíveis a $\text{PGF2}\alpha$ a partir da sua secreção a 12-13 da ovulação. $\text{PGF2}\alpha$ é também secretada durante a gestação somente no lúmen pela sinalização de estrogênio dos embriões, e não na circulação, como em suínos não gestantes, o que previne a lise dos corpos lúteos. Em animais não gestantes, a $\text{PGF2}\alpha$ é transportada ao ovário ipsilateral por um mecanismo vascular contracorrente (SENGER, 2015). A luteólise vai ocasionar a cessação da secreção de progesterona, a transformação dos corpos lúteos em corpos albicans e a remoção do feedback negativo sobre o hipotálamo, retornando a secreção de GnRH e uma nova fase folicular.

1.2 Uso de hormônios na indução e controle do ciclo estral em fêmeas suínas na organização de manejos

A eficiência reprodutiva em granjas suinícolas depende, entre outros fatores, da capacidade de programar e organizar os eventos reprodutivos de forma previsível. No entanto, a expressão natural do estro pode ser influenciada por variáveis como idade, condição corporal, estresse e sazonalidade, dificultando o controle do ciclo reprodutivo. Nesse contexto, o uso de hormônios exógenos — como gonadotrofinas (eCG e hCG), prostaglandinas e progestágenos — tem sido amplamente empregado como estratégia para indução ou sincronização do ciclo estral, especialmente em fêmeas pré-púberes ou em anestro funcional. A utilização desses protocolos hormonais possibilita o agrupamento de coberturas e partos, otimizando o uso da mão de obra e da infraestrutura, além de contribuir para a melhoria dos índices zootécnicos do plantel.

A depender da categoria das fêmeas, diferentes protocolos podem ser empregados. Em nulíparas, a hormonioterapia pode ser utilizada como indutora da puberdade, como estímulo ao estro em leitoas com atraso no desenvolvimento reprodutivo, ou ainda como ferramenta para sincronização do estro em lotes destinados ao manejo em bandas (WENTZ et al., 2007). Em primíparas e múltiparas, por outro lado, os hormônios são frequentemente utilizados para o controle do

intervalo desmame-estro (IDE), podendo ser ajustado de acordo com a condição corporal da fêmea. Essas estratégias visam reduzir os dias não produtivos (DNP) e minimizar perdas econômicas nas granjas.

O avanço na tecnificação das granjas tem permitido uma racionalização crescente da produção. Na suinocultura moderna, independentemente do tipo de relacionamento com agroindústrias, os sistemas de manejo vêm sendo aplicados de forma cada vez mais padronizada, seja em propriedades com segregação de sítios ou em unidades com ciclo completo (MEDEIROS; MIELE, 2014). No Brasil, o modelo mais comumente adotado é o de segregação por fases, em que diferentes etapas da produção (como a maternidade ou a central de inseminação) são conduzidas em sítios distintos, ao contrário do sistema de ciclo completo, onde todas as fases ocorrem na mesma propriedade (MACHADO; DALLANORA, 2014).

Nesse tipo de organização, destaca-se o sistema de manejo em bandas, que visa garantir previsibilidade nas entregas e otimização dos recursos disponíveis (SEBRAE; ABCS, 2019). Nele, as fêmeas são agrupadas de acordo com a disponibilidade de mão de obra, o espaço físico da granja e o número de matrizes (FELÍCIO, 2014). O objetivo é sincronizar os eventos de inseminação, parto e desmame em intervalos fixos — geralmente de 14, 21 ou 28 dias — facilitando a execução dos manejos e a supervisão dos animais, com impactos positivos sobre a sanidade e a produtividade.

Embora não haja um número exato de granjas que utilizam esse sistema no Brasil, sabe-se que ele é adotado há bastante tempo, sobretudo em propriedades com até 500 matrizes, onde a mão de obra é um recurso limitante (FONTANA et al., 2015). A adoção de sistemas baseados na sincronização hormonal requer organização e o uso criterioso de ferramentas farmacológicas. A hormonioterapia, embora amplamente difundida na pecuária, apresenta resultados variáveis na suinocultura, muitas vezes em função do uso indiscriminado (WENTZ et al., 2007). Ainda assim, quando bem aplicada, mostra-se eficaz no atingimento das metas de coberturas, partos e desmames.

1.2.1 Progestágenos

Talvez o hormônio que tenha o uso mais difundido na suinocultura seja o Altrenogest, utilizado principalmente para sincronizar o estro em leitoas e em

primíparas desmamadas (WANG et al., 2018). Como um progestágeno, o Altrenogest bloqueia a liberação hipotalâmica do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que por sua vez, na hipófise, inibe a liberação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) (DE RENSIS; KIRKWOOD, 2016). A manifestação do estro se dá após a queda da concentração sérica do progestágeno cerca de cinco a oito dias após o fim da ingestão. Assim, o hormônio deixa de suprimir a liberação de GnRH, FSH e LH, resultando na ovulação de folículos recrutados na fase folicular (> 5 mm) (SOEDE et al., 2007).

O Altrenogest é administrado por 14 a 18 dias consecutivos pela via oral. A dose a ser administrada em geral é de 15 a 20 mg por dia para cada animal ou conforme a orientação do fabricante (DE RENSIS; KIRKWOOD, 2016). No entanto, deve-se garantir que a fêmea receba a dose diária corretamente, visto que é comum o desenvolvimento de cistos foliculares quando o Altrenogest é administrado em doses submínimas (KAUFFOLD et al., 2007). Portanto, o sucesso na performance desse progestágeno depende de um tratamento longo e meticuloso e, muitas vezes, de alto custo, o que acaba se tornando uma desvantagem no seu uso.

Outras formas de administração de progestágenos têm sido utilizadas em caráter experimental. Alguns estudos utilizaram a via intravaginal com dispositivos contendo acetato de medroxiprogesterona (MPA) para realizar a sincronização tanto em leitoas quanto em porcas com relativo sucesso (GASPERIN et al., 2011; ULGUIM et al., 2019). Entretanto, quando comparado com outras vias de administração, os dispositivos intravaginais (DIV) mostraram resultados inferiores em termos de desempenho reprodutivo e notou-se presença de folículos persistentes (QUIRINO et al., 2020). A grande vantagem na sua utilização residiria na diminuição do número de manejos, além de manter a concentração de P4 circulante de forma constante, como comumente é feito em bovinos (MCPHEE et al., 1983).

Por último, a utilização de progesterona injetável em suínos é bastante limitada dos pontos de vista econômico e prático devido à quantidade de aplicações necessárias para que seu efeito seja satisfatório (BAILEY et al., 2010). As múltiplas aplicações mantêm a concentração do hormônio constante na circulação sanguínea. Em outras espécies, como a bovina e em pequenos ruminantes, têm sido testados protocolos de sincronização de estro com progesterona injetável de longa duração (iP4) (PUGLIESI et al., 2019; D'AVILA et al., 2022). Nesse caso, com uma única injeção do composto a concentração de P4 se mantém por um determinado tempo,

devido à sua lenta liberação no organismo (AFFANDI, 2002). Em suínos, no presente momento, ainda não são reportados estudos utilizando a iP4 em periódicos científicos. Contudo, núcleos de estudos em reprodução suína com reforço das agroindústrias tem mostrado interesse em testar a sua utilização, visando a ser uma alternativa ao uso do altrenogest (BALDESSAR, 2023).

1.2.2 Estrógenos

O uso de estrógenos na pecuária é bastante difundido, porém controverso. Alguns estudos apontam correlação entre o aparecimento de certos tipos de cânceres com a ingestão de produtos animais contendo hormônios esteróides, como leite e carne (GANMAA; SATO, 2005; QIN et al., 2004). Em alguns mercados, são banidas ou limitadas a comercialização de produtos de origem animal em que tenham sido utilizados tratamentos com esteróides (GALBRAITH, 2002).

Em suinocultura, a sincronização de estro com estrógenos foi bastante testada associando-se o benzoato de estradiol (BE) com gonadotrofina coriônica humana (hCG) e/ou gonadotrofina coriônica equina (eCG) (PATERSON et al., 1984; ESTILL, 2000). Porém, os resultados se mostraram insatisfatórios devido às baixas taxas de ovulação e concepção nas leitoas induzidas (ESTILL, 2000). Além disso, um estudo reportou a presença de cistos foliculares em um grande número de leitoas após a aplicação desse protocolo (DYCK, 1988). Outro método utilizado para manifestar estro empregando estrógenos é pela indução de pseudogestação e subsequente luteólise com prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) (HIRAYAMA et al., 2021; ZAVY et al., 1988). Nesse protocolo, a reposta fisiológica que se quer induzir é sensibilização dos corpos lúteos à aplicação de PGF₂ α (ZAVY et al., 1988). Em suínos, os corpos lúteos são refratários à uma única aplicação da PGF₂ α no início da fase luteal, necessitando de múltiplas aplicações para que a manifestação de estro ocorra de forma prematura nessa fase (ESTILL et al., 1993). Entretanto, os corpos lúteos são altamente sensíveis a uma única (ou duas) de PGF₂ α durante o período de sinalização do reconhecimento materno-fetal (NOGUCHI et al., 2010). A manutenção da gestação é sinalizada pelo embrião através da secreção de estrógenos em dois períodos subsequentes: entre 11 e 12 dias e, posteriormente, entre 15 e 30 dias (GEISERT et al., 1982; SPENCER; BAZER, 2004). É durante esse período que o corpo lúteo fica sensível à ação da PGF₂ α . O protocolo, portanto, consiste em aplicar doses de estrógenos diárias entre

o dia 11 e 15 do ciclo estral (dia 0 sendo o estro prévio) e, a partir de dez a quinze dias (D21 a D25) após ocorre a aplicação de PGF2 α (HIRAYAMA et al., 2021; NOGUCHI et al., 2016; NOGUCHI et al., 2010). As fêmeas induzidas por esse protocolo entram em cio entre 4 e 6 dias após a aplicação de PGF2 α (ESTILL, 2000). Mesmo sendo bastante eficaz, a técnica do ponto de vista comercial é impraticável devido às múltiplas aplicações de estradiol, além de afetar o bem-estar dos animais por ser bastante dolorida (NOGUCHI et al., 2010).

1.2.3 Gonadotrofinas

Duas principais gonadotrofinas são bastante utilizadas no controle da ovulação em suínos: eCG e hCG. É muito comum a utilização de um composto contendo esses dois hormônios para induzir a puberdade em leitoas atrasadas, o PG600 (400 UI de eCG e 200 UI de hCG) (LEWCHALERMWONG et al., 2020). O eCG, classicamente, possui função na maturação folicular, sendo, portanto, um agonista de FSH; enquanto o hCG é capaz de causar a luteinização e ovulação dos folículos maduros, cumprindo papel de agonista de LH (WENTZ et al., 2007).

Dependendo do protocolo a ser adotado, esses dois hormônios podem ser utilizados de forma isolada ou em conjunto, e com concentrações variadas (ESTILL, 2000). Quando se quer, por exemplo, atrasar o estro em algumas leitoas prolongando a fase luteal, administra-se o eCG a partir do dia 11 ou 12 do ciclo estral (dia 0 correspondendo ao dia da ovulação anterior), seguido da administração de hCG 48, 72 ou até mesmo 96 horas depois, para induzir a formação de corpos lúteos acessórios (ESTILL, 2000). A fase luteal pode ser cessada após a aplicação de PGF2 α .

Outra gonadotrofina bastante usada experimentalmente é o hormônio luteinizante porcino (pLH). Esse hormônio é utilizado para induzir a ovulação controlada em desmamadas (FALCETO et al., 2023). A injeção de 5 mg de pLH induz a ovulação em média 38 horas após sua aplicação (CASSAR et al., 2005).

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivos gerais: (1) avaliar e caracterizar a resposta endócrina de leitoas submetidas a um protocolo de controle do ciclo estral com o fornecimento de gonadotropinas exógenas durante a fase luteal e seu consequente desempenho reprodutivo; e (2) caracterizar alterações morfológicas nas tubas uterinas de leitoas tratadas com gonadotrofinas em diferentes momentos a fim de caracterizar diferentes fase do ciclo estral.

2.2 Objetivos Específicos

Para o objetivo geral 1, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- 1) Avaliar a responsividade ao tratamento com PGF2 α em momentos distintos, após tratamento com gonadotropina.
- 2) Avaliar a resposta endócrina de três grupos de leitoas, sendo um o controle (sem tratamento) e os outros dois tratados com diferentes protocolos de sincronização estral, utilizando gonadotrofinas exógenas (eCG e hCG) durante a fase luteal em diferentes concentrações.
- 3) Avaliar o desempenho reprodutivo desses animais tratados em termos de taxa retorno ao estro, taxa de prenhez, taxa de parto e número de leitões nascidos e nascidos vivos.

Para o objetivo geral 2, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- 1) Mimetizar as fases folicular e luteal em três grupos distintos de leitoas após aplicação de distintos protocolos de sincronização com gonadotrofinas exógenas (eCG e hCG).

- 2) Avaliar a resposta endócrina após o tratamento em termos das concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona
- 3) Avaliar as alterações morfométricas das tubas uterinas após os tratamentos com gonadotrofinas

3 Artigos

3.1 Artigo 1

Reproductive performance in gilts submitted to non-steroidal therapies to prolong the luteal phase of the estrous cycle

Camila R. C. Brito, Ágatha D. Cordeiro; Pricila Baldessar, Carolini Schultz, Monike Quirino, Rafael R. Ulguim, Paulo B D Gonçalves, Thomaz Lucia Jr, Ivan Bianchi, Bernardo G. Gasperin

Aceito para publicação na revista Domestic Animal Endocrinology

Reproductive performance in gilts submitted to non-steroidal therapies to prolong the luteal phase of the estrous cycle

Camila R. C. Brito¹, Ágatha D. Cordeiro¹; Pricila Baldessar^{2,4}, Carolini Schultz⁴, Monike Quirino⁴, Rafael R. Ulguim³, Paulo B D Gonçalves⁵, Thomaz Lucia Jr.¹, Ivan Bianchi⁴,
Bernardo G. Gasperin¹,

¹Fibra, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas-RS, Brazil., ²Pamplona Alimentos S. A., 89164-900 - Rio do Sul-SC, Brazil

³Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91540-000, Porto Alegre-RS, Brazil, ⁴NEPPA, Instituto Federal Catarinense, 89245-000 - Araquari-SC, Brasil,

⁵ Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

Abstract

Synchronized cyclicity of replacement gilts is crucial to optimize breeding herd management, but protocols with progestogens present inconsistent response. This study tested two synchronization protocols during the luteal phase of the estrous cycle in gilts. In Experiment 1, gilts were assigned to three groups (n = 6 each), considering the day of their third estrus as D0. The control received no treatment. The other groups received two hCG doses (1,500 IU each) on D12 and D15 and two doses of a Prostaglandin F2 α analogue (PGF) 6-h apart on D25 (PGF25) or on D30 (PGF30). Estrus expression occurred earlier in PGF30 than in PGF25 (P = 0.0003). After the PGF treatment, serum progesterone concentrations were similar for gilts of PGF25 (P > 0.05) but reduced for those of PGF30 (P = 0.011). In Experiment II, there were three groups (n = 12 gilts each): control (no treatment); eCG+hCG (400 UI eCG on D10 plus 500 UI hCG on D12); and hCG2 (two hCG doses, 1500 UI each) on D12 and D15. On D30, gilts of eCG+hCG and hCG2 that did not express estrus received two PGF doses (250 μ L each), within a 6-h interval. After estrus expression, all gilts were inseminated. Serum progesterone concentrations were similar in all groups at D10 (P > 0.05) and increased after D20 for gilts in eCG+hCG and hCG2 (P < 0.05). Control gilts presented shorter inter-estrus interval and larger litter size than those in eCG+hCG and hCG2 (P < 0.05). Treatment with hCG plus PGF 30 d after estrus expression resulted in anticipated estrus expression and reduced serum progesterone concentration. Although the luteal phase of the estrus cycle was prolonged after hCG treatment, total litter size declined.

Keywords: Luteal phase, estrus, eCG, hCG, inter-estrus interval, litter size.

1. Introduction

Efficient methods to synchronize the estrus cycle in female swine are relevant for breeding herd management, especially in farms using batch farrowing systems with intervals longer than 7 d. Estrus synchronization enables to program the dates of artificial inseminations (AI) and farrowings, making the activity more productive (Kraeling and Webel, 2015). The current strategies to synchronize estrus in gilts and sows are mainly through the oral administration of a progestogen (altrenogest), which is generally fed daily 14-18 d and withdrawn 2 to 3 d after, resulting in estrus expression for more than 75% of the treated females (Estill, 2000; Wang et al., 2018). However, the efficacy of such treatment may be limited when the progestogen's consumption by the females is not precise (Kaeoket, 2008; Ziecik et al., 2017).

Estrus synchronization in swine females could be conducted by inducing a pseudopregnancy status, through administration of estrogens, followed by treatment with prostaglandin-F2 α or one of its analogues (PGF) to promote luteolysis at the beginning of a new estrous cycle (Zavy et al., 1988; Noguchi et al., 2010). Nevertheless, the use of steroid hormones in farm animals is currently banned in some markets, due to public health concerns related to the potential presence of residues in the meat and the milk of the treated animals (Galbraith, 2002; Qin et al., 2004; Gamma and Sato, 2005).

Gonadotropins (eCG and hCG) are commonly used for estrus induction in gilts. Frequently, treatment with 400 IU eCG and 200 IU hCG results in estrus expression within 5 d in 50-90% of the gilts (Kraeling and Webel, 2015). Treatment with eCG and hCG within an interval of at least 72 h may prolong the estrus cycle, through induction of accessory corpora lutea (Rampacek et al., 1976; Guthrie, 1979; ten Haaf et al., 2002). The single use of hCG, either in one or in two doses, may also prolong the luteal phase of the estrus cycle and the inter-estrus interval, having a dose-dependent effect (Guthrie and Bolt, 1983; Soede et al., 2001). However, in none of these studies, the effect of the gonadotropin treatment on the subsequent reproductive performance was assessed.

We hypothesized that the administration of gonadotropins followed by PGF2 would lead to the formation of accessory corpora lutea, prolonging inter-estrus interval, but it would not affect the subsequent pregnancies and litter size. Therefore, the objectives of this study were (1) to assess the responsiveness of the corpora lutea to the administration of PGF in two different intervals after estrus synchronization in gilts using hCG (2) and to evaluate the effect of estrus synchronization using hCG and eCG on parameters of reproductive performance.

2. Material and methods

All experimental procedures involving animals were approved by the Ethics Committee on the use of animals of the Instituto Federal Catarinense (protocols # 347/2020 and #380/2021).

2.1 Experiment I

2.1.1 Experimental design

This experiment was conducted in the Campus Araquari of the Instituto Federal Catarinense (26° 22' 12" S, 48° 43' 20" W), including 18 crossbred F1 (Large White X Landrace) gilts. The gilts (n = 6 per pen) were fed a commercial diet (140 g/kg crude protein, 7 g/kg minimum total lysine, 20 g/kg minimum ethereal extract, 70 g/kg maximum raw fiber), with *ad libitum* access to water.

From the time of selection, the gilts were submitted to estrus detection through back pressure conducted by a trained technician in the presence of a sexually mature boar, twice daily. Gilts were considered in estrus if they presented positive response to back pressure, and vulvar hyperemia and swelling. At the time of the first estrus detection, the gilts were weighed. Thereafter, gilts were monitored for three consecutive estruses within regular intervals.

As shown in Fig. 1, the day of the expression of the third estrus after selection (D0), the gilts were allocated to three treatments (n = 6 each). In the control, no treatment was applied. The remaining gilts received two doses of 1500 IU hCG (Chorulon®, MSD saúde animal, São Paulo, SP, Brazil), I.M. on D12 and D15. Then, two doses of 250 µg of a Prostaglandin F2α (PGF) analogue (Sodium cloprostenol, Sincrocio®, Ouro Fino saúde animal, Cravinhos, SP, Brazil) were administered I.M., within a 6-h interval, composing the other two treatments, according to the day of the treatment: D25 (PGF25); or D30 (PGF30).

2.1.2 Hormonal assays

Blood samples were collected by jugular venipuncture, with a 20 mL syringe. Samples were collected on the day of the expression of the subsequent estrus, from gilts of all treatments. Additionally, samples were collected on D25, D27 and D30 from the gilts of PGF25, and on D30, D32 and D35 from the gilts of PGF30.

Blood samples were centrifuged at 1,500 x G for 10 min, for serum separation. Serum was stored at -20°C in 1.5 mL tubes and sent to a commercial laboratory for analysis. Serum progesterone (P4) concentrations were detected by chemiluminescence (Elecsys Progesterone III Cobas Assay, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; REF 07092539). Intra and inter-assay coefficient of variations were inferior to 10%.

Experiment II:

2.2.1 Experimental design.

The experiment was conducted on a gilt development unit (GDU) in the Santa Catarina state (27°07'35.4"S 49°51'21.9"W), which housed crossbred F1 gilts (Landrace x Large White) from 179 d of age until service, with a minimum 220 d of age and 130 kg liveweight. Upon their arrival at the GDU, gilts were maintained in collective pens (1.55 m² per gilt) and fed a commercial diet (144.03 g/kg crude protein, 6.76 g/kg minimum total lysine, 30.74 g/kg minimum ethereal extract, and 39.75 g/kg maximum raw fiber), with *ad libitum* access to water.

In the routine management at the GDU, estrus detection was conducted daily by trained technicians in the presence of a sexually mature boar. The day of their first estrus detected in the GDU (heat-no-service) was considered as D0, when 36 gilts were randomly assigned to three treatments (n = 12 each), as summarized in Fig. 2. The control received no treatment. Gilts in eCG+hCG received 400 UI eCG on D10 (Novormon®, Zoetis, Campinas, SP, Brazil) and 500 UI hCG on D12 (Chorulon®, MSD saúde animal), I.M. Gilts in hCG2 received two doses of 1500 UI hCG (Chorulon®, MSD saúde animal) I.M., on D12 and D15. On D10, all gilts were placed in individual stalls until their following estrus. On D30, the gilts that did not express estrus received two doses of 250 µL of a PGF analogue (Sodium cloprostenol, Sincrocio®, Ourofino saúde animal), I.M, within a 6-h interval.

Ten d after D0, gilts were submitted to flush feeding (217.86 g/kg crude protein, 14.10 g/kg minimum total lysine, 59.03 g/kg minimum ethereal extract, 29.64 g/kg maximum raw fiber) and placed in individual stalls until the expression of the following estrus. After estrus detection, gilts received up to 3 intracervical AI (depending on the estrus duration) with 2.0×10^9 spermatozoa, at 24-h intervals. Pregnancy detection was performed after 25 to 35 d, using a portable ultrasound (Sonoscape AV5; convex probe 3.5/5.0MHz RFID, Shenzhen, China). Thereafter, gilts are regrouped in collective pens (1.74 m² per gilt) until pregnancy diagnosis. The gilts with positive pregnancy diagnosis were sent to the destination farm, where they will spend their subsequent reproductive cycles.

2.2.2 Hormonal assays

Blood samples were collected from all gilts on D10 and D20. Furthermore, samples were collected on D25, D30 and D35, only from gilts that were not in estrus on those days. All samples were collected by jugular venipuncture, using a 10 mL syringe.

Samples were centrifuged at 1,500 x G for 10 min to separate the serum and stored at -20°C in 1.5 mL tubes. Serum P4 concentrations were detected in a commercial laboratory, through chemiluminescence, as described for Experiment I.

2.3 Statistical analysis.

In Experiment I, the Shapiro-Wilk's test indicated lack of normality for all responses of interest. Data of serum P4 concentration were transformed to logarithmic and then compared between treatments by analyses of variance with repetitive measures, with the effect of individual females nested within the effect of the day of treatment. Comparison of means were conducted with the Tukey test. The intervals from hCG and PGF treatments and estrus expression were through the Kruskal-Wallis analysis of variance for non-parametric data.

In Experiment II, frequency distributions were applied to describe the frequency of estrus expression and the dispersion of serum P4 concentrations over time per group after the treatments. All responses of interest were submitted to the Shapiro-Wilk test of normality; for those lacking normality, arcsine transformations were applied. The inter-estrus intervals and the total litter size were compared across treatments, whereas serum P4 levels were compared among treatments at each day of blood collection. All such comparisons were done through analyses of variance considering the age and the liveweight at D0 as co-variables, followed by comparisons of means using the Tukey test. Farrowing rates were compared across treatments through the chi-square test. All statistical analyses were performed on [Statistix®](#) (2013).

3. Results

3.1 Experiment I

Gilts of PGF25 and PGF30 expressed estrus in similar periods after hCG treatment ($P > 0.05$). However, the period of estrus expression after the PGF treatment in gilts of PGF30 (6.3 ± 0.8 d) was shorter ($P = 0.0003$) than in the gilts of PGF25 (19.5 ± 0.7 d, [Fig. 3](#)). In the control, the inter-estrus interval (19.5 ± 0.5 d) was shorter ($P = 0.0002$) than those observed for PGF25 (37.4 ± 0.7 d) and PGF30 (36.3 ± 0.7 d), which did not differ from each other ($P > 0.05$).

Serum P4 concentration from gilts of PGF25 did not differ ($P > 0.05$) across the three periods after the PGF treatment ([Fig. 4](#)). In PGF30, serum P4 concentration levels were reduced 2 d after the PGF treatment, and it was lowest 5 d after the PGF treatment ($P = 0.011$).

3.2 Experiment II

The gilts presented similar age (197.9 ± 6.3 d) and live weight at D0 (125.9 ± 9.5 kg), with no difference ($P > 0.05$) among treatments (data not shown). All gilts expressed the second estrus after treatments and were subsequently inseminated. In the control, most gilts expressed estrus within D20 and D23 ([Fig. 5](#)). Within D24 and D33, most estrus expressions were from gilts in eCG+hCG, whereas gilts of hCG2 showed estrus signs from D33 to D36.

Serum P4 concentrations were reduced during the first 10 d after treatment for all gilts, but increased afterwards, except for gilts in control ([Fig. 6](#)). Serum P4 concentrations did not

differ among treatments ($P > 0.05$) on D10 ([Table 1](#)). However, on both D20 and D25, control gilts presented lower P4 concentration than those in the other treatments, while gilts in hCG2 presented the highest concentrations ($P < 0.0001$).

For gilts treated with hCG2, the inter-estrus interval was longer ($P < 0.0001$) than for those in the other treatments ([Table 3](#)). Compared to the control, gilts in eCG+hCG presented longer inter-estrus interval ($P < 0.0001$).

Among treatments, farrowing rates did not differ ($P > 0.05$, [Table 3](#)). Control gilts farrowed larger litters than those in hCG2 ($P = 0.0131$). The total litter size of gilts in eCG+hCG did not differ from those of any other treatment ($P < 0.05$).

4. Discussion

This study indicates that the combined use of hCG and PGF can effectively synchronize the cyclicity of gilts. In Experiment I, gilts treated with two doses of hCG on D12 and D15 after their third estrus followed by a luteolytic on D30 showed estrus signs nearly 13 d before the gilts receiving the same hCG treatment but with PGF administered on D25. In Experiment II, the same hCG treatment resulted in an inter-estrus interval nearly 7-d longer than that of gilts receiving eCG+hCG and 14-d longer than that of control gilts. That prolonged inter-estrus interval is likely related to the increased serum P4 concentration observed on the day of the PGF treatment for gilts in PGF30 in Experiment I, which declined 2 d later. In Experiment II, although the serum P4 concentration was decreased on D25 for gilts in the control and in eCG+hCG, such concentration remained high in gilts of hCG2 group in the same period. Since increased P4 concentrations would simulate the action of active corpora lutea, the synthesis of GnRH and LH would be inhibited (reviewed by [Lents et al., 2020](#)). We hypothesize the hCG treatment may have induced the formation of accessory corpora lutea due to the luteinization of follicles in the ovaries ([Guthrie and Polge, 1976](#); [Guthrie, 1979](#); [Soede et al., 2001](#)). Such hypothesis could be confirmed by *post-mortem* exam of the ovaries. Nonetheless, as this study was conducted in a commercial farm and the gilts remained in the breeding herd for subsequent cycles, that was unfeasible.

Although gilts treated with two doses of hCG presented prolonged inter-estrus interval, their estrus expression was concentrated within a shorter period (at most 4 d) compared to the gilts in other treatments, which expressed estrus earlier but with a large dispersion. That emphasizes that the hCG treatment tested in the present study may be a feasible alternative for estrus synchronization, considering the limitations of the protocols currently available for use in female swine. Exogenous P4 administration through intravaginal devices is efficient for

estrus synchronization in cows (reviewed by [Bó et al., 2016](#)), but provides inconsistent response in female swine ([Ulguim et al., 2019](#); [Quirino et al., 2020](#)). That can also be said about the oral supplementation with altrenogest ([Werlang et al., 2011](#)). Additionally, many markets restrict the use of steroid hormones, due to the concern that meat and milk consumers may be exposed to steroid residues ([Galbraith, 2002](#); [Qin et al., 2004](#); [Ganmaa and Sato, 2005](#)). The findings of the present study signal that hCG treatment to synchronize cyclicity of gilts would be particularly relevant for farms working with batch farrowing systems, concentrating estrus expression and AI and preventing disruptions in the production flow ([Lurette et al., 2008](#)).

Despite its efficiency on synchronizing gilts' cyclicity, hCG treatment was related to reduction in total litter size, in Experiment II. As there were no differences in farrowing rates across treatments, that may have occurred due to the increased serum P4 concentrations observed for gilts in hCG2 which were nearly three-fold greater compared to the gilts in eCG+hCG. Increased P4 concentration generally improves uterine vascularization and development ([Bailey et al., 2010](#)), which would likely benefit litter size. However, that may also result in detrimental effects for embryo survival ([Mallmann et al., 2020](#)), since in early pregnancy most of the available circulatory P4 is metabolized by the liver while it still secreted at low concentrations by the corpora lutea ([Langendijk and Peltoniemi, 2013](#)). Besides, high concentrations of endogenous P4 for an extended period of time are likely suppressing the follicular growth ([Soede et al., 2007](#)). Therefore, less large follicles would be available to ovulate at estrus time. Additionally, a previous study showed that adding high P4 concentrations to the medium for in vitro culture of mice ovarian tissue may impair follicular growth and ovulation rates ([Komatsu and Masobuchi, 2017](#)). Apparently, P4 may control follicular size through the progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) which is present in follicles at different stages of development. This is also related to cell survival and apoptosis ([reviewed by Rohe et al., 2008](#)). Even though the mechanisms capable of impairing ovulation or embryo survival are still unclear, such potential pathways should not be disregarded in the current study given the observed effects of the hCG treatment in the P4 concentration and litter size. As the intensity of the response to hCG at ovarian level may be dose dependent ([Soede et al., 2001](#)), further research testing distinct hCG doses may be necessary to determine a treatment that can allow efficiently synchronized cyclicity without losses in the subsequent litter size.

5. Conclusions

The treatment with two doses of hCG followed by administration of a luteolytic after the third estrus resulted in prolonged inter-estrus interval and was more efficient in

synchronizing estrus expression in gilts. Nonetheless, the first litter size was reduced compared to the control.

Acknowledgments

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), which funded the scholarship of the first author; Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina – FAPESC, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS, that financed the study; and Pamplona Alimentos S/A that provided the animals and facilities used in this study.

Conflict of interest: the authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Bailey, D.W., Dunlap, K.A., Frank, J.W., Erikson, D.W., White, B.G., Bazer, F.W., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., 2010. Effects of long-term progesterone on developmental and functional aspects of porcine uterine epithelia and vasculature: progesterone alone does not support development of uterine glands comparable to that of pregnancy. *Reproduction* 140, 583-594. <http://dx.doi.org/10.1530/REP-10-0170>
- Bó, G.A.; de la Mata, J.J.; Baruselli, P.S.; Menchaca, A. 2016. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 86, 388-396. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.053>
- Estienne MJ, Crawford RJ. Characteristics of estrous cycles in gilts treated with gonadotropins after estrus or treatment with a progestogen. *Theriogenology*. 2015;83(4):459-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.03.004>
- Estill, C., 2000. Current concepts in estrus synchronization in swine. *J. Anim. Sci.* 77 (E-Suppl), 1-9. <http://dx.doi.org/10.2527/jas2000.77E-Suppl1m> .
- Galbraith, H. 2002. Hormones in international meat production: biological, sociological and consumer issues. *Nutr. Res. Rev.* 15, 293-314. <http://dx.doi.org/10.1079/NRR200246>
- Gamma, D., Sato, A., 2005. The possible role of female sex hormones in milk from pregnant cows in the development of breast, ovarian and corpus uteri cancers. *Med. Hypotheses* 65, 1028-1037. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.06.026>

- Guthrie, H.D., 1979. Fertility after estrous cycle control using gonadotropin and prostaglandin F2-alpha treatment of sows. *J. Anim. Sci.* 49, 158-162. <http://dx.doi.org/10.2527/jas1979.491158x>
- Guthrie, H.D., Polge, C., 1976. Control of oestrus and fertility in gilts with accessory corpora lutea by prostaglandin analogues, ICI 79,939 and ICI 80,996. *J. Reprod. Fertil.* 48, 427-430. <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0480427>
- Guthrie, H.D., Bolt, D.J. 1983. Changes in plasma estrogen, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 alpha during blockade of luteolysis in pigs after human chorionic gonadotropin treatment. *J. Anim. Sci.* 57, 993-1000. <http://dx.doi.org/10.2527/jas1983.574993x>
- Kaeoket, K., 2008. Study on the oestrous synchronization in gilts by using progestin altrenogest and hCG: its effect on the follicular development, ovulation time and subsequent reproductive performance. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 127-129. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00901.x>
- Komatsu, K., Masubuchi, S. 2017. The concentration-dependent effect of progesterone on follicle growth in the mouse ovary. *J. Reprod. Dev.* 63, 271-277. <https://doi.org/10.1262%2Fjrd.2016-154>
- Kraeling, R.R., Webel, S.K., 2015. Current strategies for reproductive management of gilts and sows in North America. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6, 3. <http://dx.doi.org/10.1186/2049-1891-6-3>
- Langendijk, O., Peltoniemi, O., 2013 How does nutrition influence luteal function and early embryo survival. *Biosci. Proc.* 68, 145-158. <http://dx.doi.org/10.1530/biosciprocs.19.0015>
- Lents, C.A., Lindo, A.N., Hileman, S.M., Nonneman, D.J. 2020. Physiological and genomic insight into neuroendocrine regulation of puberty in gilts. *Dom. Anim. Endocrinol.* 73, 106446. <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend-2020-106446>
- Lurette, A., Belloc, C., Touzeau, S., Hoch, T., Seegers, H., Fourichon, C., 2008. Modelling batch farrowing management within a farrow-to-finish pig herd: influence of management on contact structure and pig delivery to the slaughterhouse. *Animal* 2, 105-116 <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731107000997>
- Mallmann, A.L., Arend, L.S., Oliveira, G.S., Mellagi, A.P.G., Bortolozzo, F.P., Knox, R.N. 2020. Effects of flush feeding strategy before breeding on reproductive performance of

- modern replacement gilts: impacts on ovulation rate and litter traits. *J. Anim. Sci.* 98, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1093/jas/skaa186>
- Noguchi. M., Yoshioka, K., Suzuki, C., Arai, S., Itoh, S., Wada, Y., 2010. Estrus synchronization with pseudopregnant gilts induced by a single treatment of estradiol dipropionate. *J. Reprod. Dev.* 56, 421-427. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.10-006t>
- Qin, L.Q., Wang, P.Y., Kaneko, T., Hoshi, K., Sato, A., 2004. Estrogen: one of the risk factors in milk for prostate cancer. *Med. Hypotheses* 62, 133-142. [https://doi.org/10.1016/s0306-9877\(03\)00295-0](https://doi.org/10.1016/s0306-9877(03)00295-0)
- Quirino, M.; Ulguim, R.D.R.; Bernardi, M.L.; Pereira, V.N.; Magoga, J.; Gianluppi, R.D.F.; Mellagi, A.P.G.; Gasperin, B.G.; Bortolozzo, F.P. Follicular dynamic and reproductive performance of gilts submitted to estrous cycle synchronization using two different progestogen sources. *Theriogenology* 158, 31-38, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.08.035>
- Rampacek, G., Schwartz, F., Fellows, R., Robison, O., Ulberg, L., 1976. Initiation of reproductive function and subsequent activity of the corpora lutea in prepuberal gilts. *J. Anim. Sci.* 42, 881-887.
- Rohe, H.J., Ahmed, I.S., Twist, K.E., Craven, R.J., 2009. PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1): a targetable protein with multiple functions in steroid signaling, P450 activation and drug binding. *Pharmacol. Ther.* 121, 14-19. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00452-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00452-6)
- Sell-Kubiak, E., Knol. E.F., Mulder, H.A., Pszczola. M., 2021. Unraveling the actual background of second litter syndrome in pigs: based on Large White data. *Animal* 15, 100033. <http://dx.doi.org/10.1016/j.animal.2020.100033>
- Soede, N.M., Raaphorst, C.J.M., Bouwman, E.G., Kirkwood, R.N., 2001. Effects of injection of hCG during the estrous cycle on follicle development and the inter-estrous interval. *Theriogenology* 55, 901-909. [http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00452-6](http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00452-6)
- Soede, N.M., Bouwman, E.G., Langendijk, P., van der Laan, I., Kanora, A., Kemp, B., 2007. Follicle development during luteal phase and altrenogest treatment in pigs. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 329-332. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00779.x>

- ten Haaf, W. Thacker, P.A., Kirkwood, R.N., 2002. Effect of injecting gonadotrophins during the luteal phase of the estrous cycle on the inter-estrus interval of gilts. *Can. J. Anim. Sci.* 82, 457–459.
- Ulgum, R.D.R., Mallmann, A.L., Gasperin, B.G., Bernardi, M.L., Wentz, I., Mellagi, A.P.G., Bortolozzo, F.P. 2019. Effects of intravaginal devices containing different dosages of medroxyprogesterone acetate for the control of the estrous cycle in gilts. *Anim. Reprod. Sci.* 210, 106200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106200>
- Wang, Z., Liu, B.S., Wang, X.Y., Wei, Q.H., Tian, H., Wang, L.Q., 2018. Effects of altrenogest on reproductive performance of gilts and sows: a meta-analysis. *Anim. Reprod. Sci.* 197,10-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.035>
- Werlang, R.F., Argenti, L.E., Fries, H.C.C., Bernardi, M.L., Wentz, I., Bortolozzo, F.P. 2011. Effects of breeding at the second oestrus or after post-weaning hormonal treatment with altrenogest on subsequent reproductive performance of primiparous sows. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 818-823. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01747.x>
- Zavy, M.T., Geisert, R.D., Buchanan, D.S., Norton, S.A. 1988. Estrogen-induced pseudopregnancy in gilts: Its use in estrus synchronization and subsequent influence on litter response. *Theriogenology* 30, 721-732. [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691x\(88\)90307-x](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691x(88)90307-x)
- Ziecik, A.J., Klos, J., Przygodzka, E., Milewski, R., Jana, B., 2017. Aberrant effects of altrenogest and exposure to exogenous gonadotropins on follicular cysts appearance in gilts. *Theriogenology* 89, 250-254. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.10.028>

List of figures

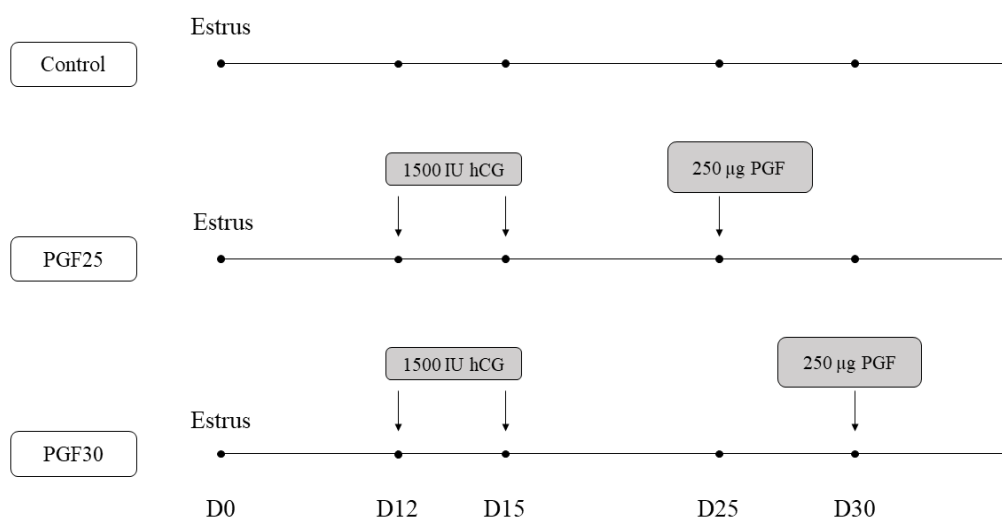


Fig. 1. Experimental design of Experiment I (n = 6 gilts per group)*

*PGF25: administration of two doses (250 µg each) of a Prostaglandin F2 α analogue (PGF) within a 6-h interval, in the 25th d after the day of the third estrus (D0).

PGF30: administration of two doses (250 µg each) of a Prostaglandin F2 α analogue (PGF) within a 6-h interval, in the 30th d after the day of the third estrus (D0).

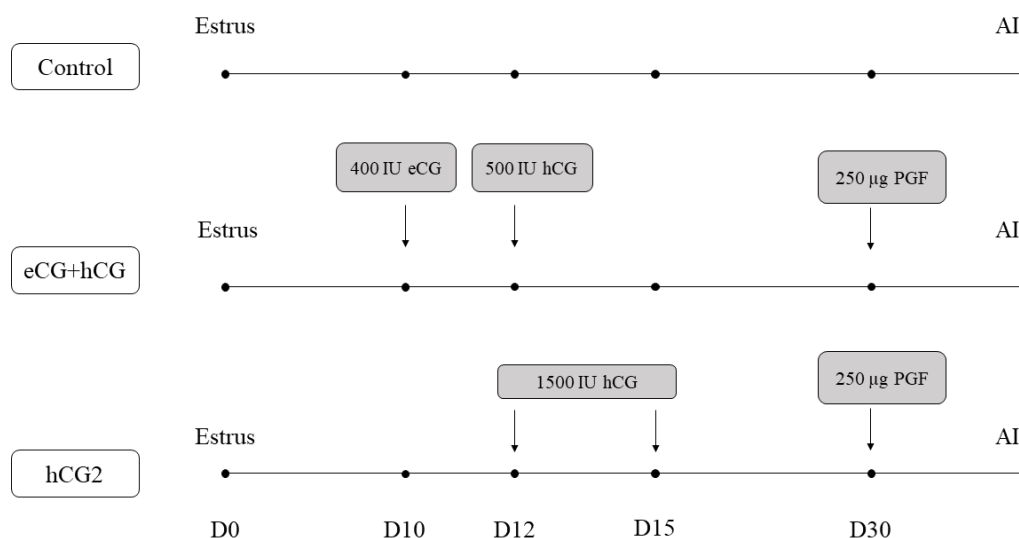


Fig. 2. Experimental design of Experiment II (n = 12 gilts per group)*

*eCG+hCG: 400 UI eCG at D10 plus 500 UI hCG at D12; hCG2: two hCG doses (1500 UI each) at D12 and D15.

In both such groups, gilts that did not exhibit estrus until the 30th d after the day of the third estrus (D0) received two doses (250 µg each) of a Prostaglandin F2α analogue (PGF) within a 6-h interval, in the D30.

AI: intracervical artificial insemination at 24-h intervals after estrus detection (up to 3 AI, depending on the estrus duration).

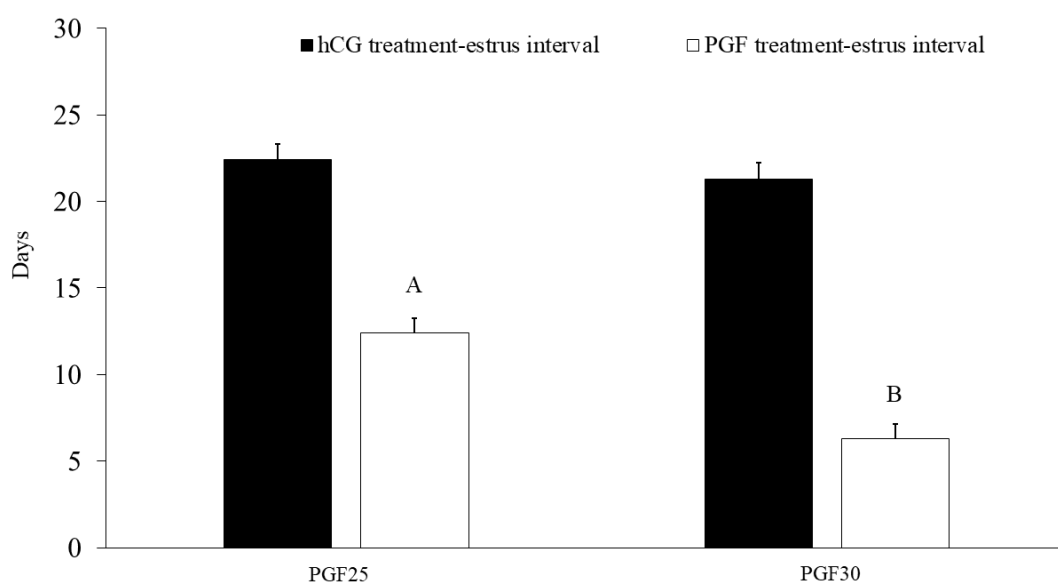


Fig. 3. Period until the expression of the fourth estrus for gilts treated with two hCG doses (1500 UI each) at the 12th and at the 15th d after the third estrus plus two doses of a Prostaglandin F2 α (PGF) analogue (250 μ g each) at a 6-h interval in distinct periods - Experiment I*

*PGF25: administration in the 25th d after the third estrus

PGF30: administration in the 30th d after the third estrus.

^{A,B}Means $\pm$ SEM with distinct superscripts differ by $P = 0.0003$

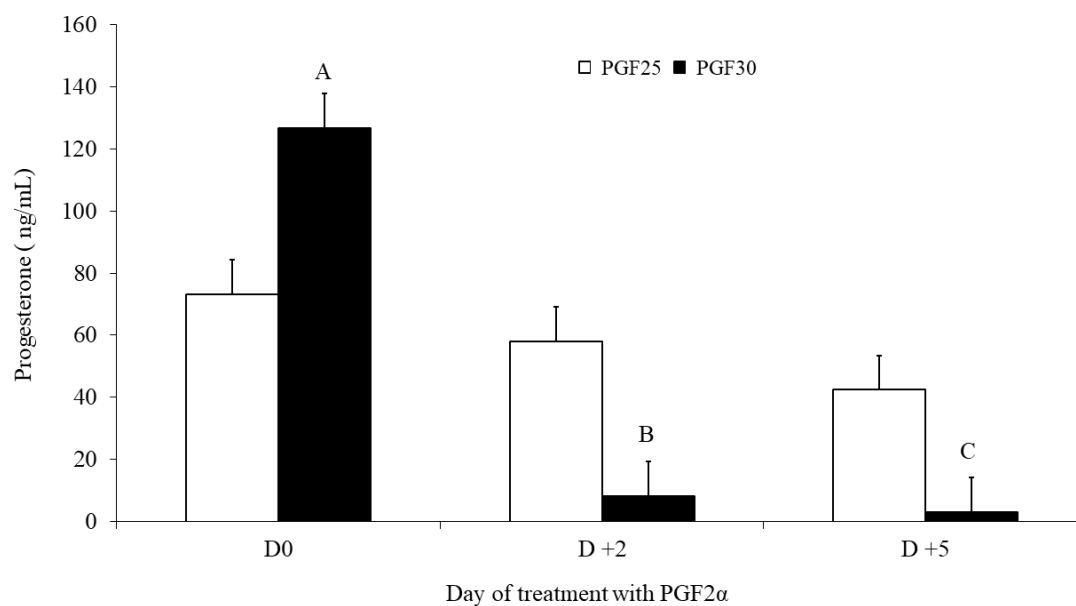


Fig. 4. Serum progesterone concentration in gilts treated with two hCG doses (1500 UI each) at the 12th and at the 15th d after the third estrus plus two doses of a Prostaglandin F2α (PGF) analogue (250 µg each) at a 6-h interval in distinct periods – Experiment I*

*PGF25: administration in the 25th d after the third estrus

PGF30: administration in the 30th d after the third estrus.

^{A,B,C} Distinct superscripts indicate significant differences ($P = 0.011$)

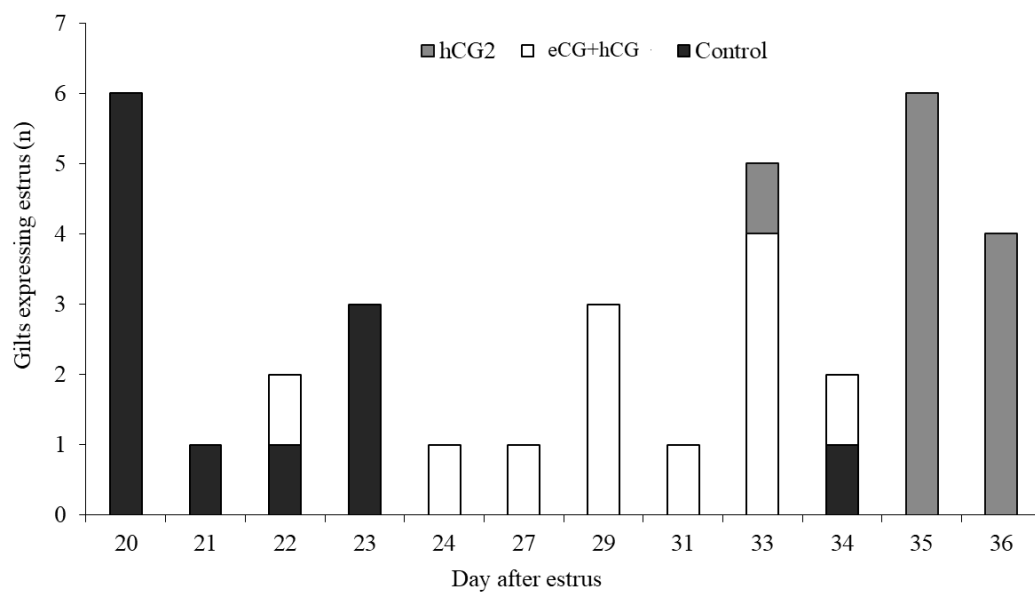


Fig. 5. Distribution of estrus expression in gilts per treatment - Experiment II*

*Control: no treatment; eCG+hCG: 400 UI of eCG at D10 plus 500 UI of hCG at D12; hCG2: two doses of 1500 UI hCG at D12 and D15 (n = 12 gilts per group)

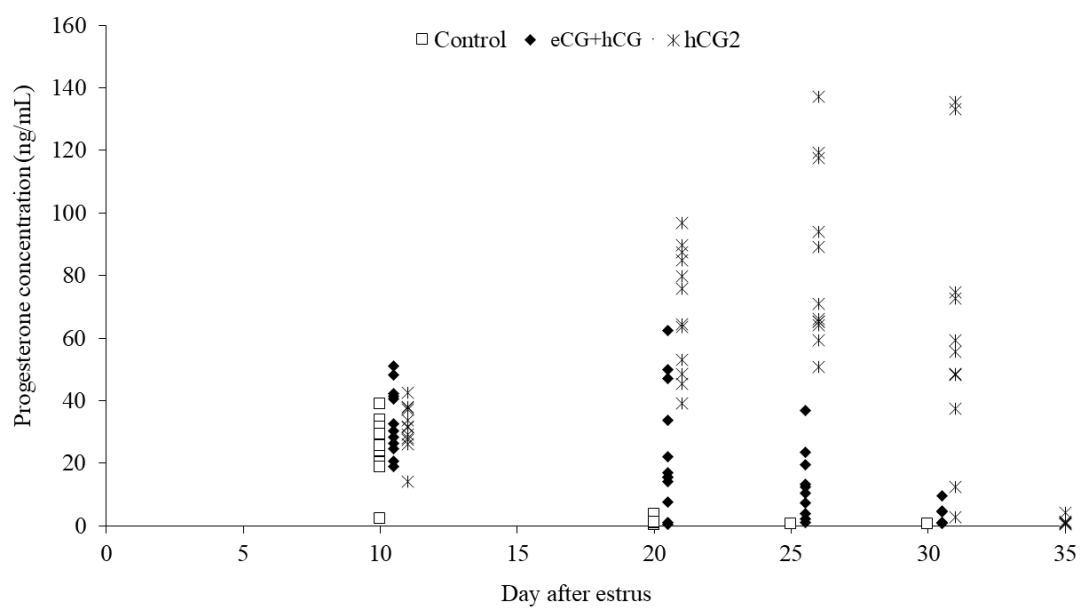


Fig. 6. Serum progesterone concentration per treatment considering the day of the first detected estrus as D0 - Experiment II*

*Control: no treatment; eCG hCG: 400 UI of eCG at D10 plus 500 UI of hCG at D12; hCG2: two doses of 1500 UI hCG at D12 and D15

List of Tables

Table 1. Serum progesterone concentration after the day of their first detected estrus (D0) in gilts submitted to gonadotrophin treatment - Experiment II*

Treatment	Progesterone concentration (mg/mL)		
	D10	D20	D25
Control	25.9 ± 3.7 (n = 12)	1.2 ± 6.6 ^C (n = 12)	0.5 ± 33.5 ^C (n = 1)
eCG+hCG	33.8 ± 3.7 (n = 12)	23.9 ± 6.6 ^B (n = 12)	3.6 ± 13.7 ^B (n = 10)
hCG2	31.4 ± 3.7 (n = 12)	69.0 ± 6.6 ^A (n = 12)	60.7 ± 9.7 ^A (n = 12)

*Control: no treatment; eCG+hCG: 400 UI of eCG at D10 plus 500 UI of hCG at D12; hCG2: two hCG doses (1500 UI each) at D12 and D15

^{A,B,C} Means ± SEM with distinct superscripts differ by at least $P < 0.001$

Table 2. Inter-estrus interval, farrowing rate and total litter size in the first gestation for gilts submitted to gonadotrophin treatment - Experiment II*

Treatment	n	Inter-estrus interval (d)	Farrowing rate (%)	Total litter size
Control	12	22.2 ± 1.6 ^C	91.7 (11/12)	15.3 ± 1.3 ^X
eCG+hCG	12	29.7 ± 1.6 ^B	91.7 (11/12)	13.1 ± 1.3 ^{XY}
hCG2	12	36.2 ± 1.6 ^A	91.7 (11/12)	11.3 ± 1.3 ^Y

*Control: no treatment; eCG+hCG: 400 UI of eCG at D10 plus 500 UI of hCG at D12; hCG2: two hCG doses (1500 UI each) at D12 and D15.

^{A,B,C}Means ± SEM differ by at least $P < 0.0001$

^{X,Y}Means ± SEM differ by $P = 0.018$

3.2 Artigo 2

Morphometric Evaluation of the Ampullae of the Oviducts in Prepubertal Gilts Treated With Chorionic Gonadotropins

Camila R. C. Brito, Veronica Hoyos-Marulanda, Luis A. X. Cruz, Bernardo G.
Gasperin, Arnaldo D. Vieira, Rafael G. Mondadori, Thomaz Lucia Jr

Aceito para publicação na revista Animal Reproduction

Morphometric Evaluation of the Ampullae of the Oviducts in Prepubertal Gilts Treated With Chorionic Gonadotropins

Camila Ribeiro Carvalho de Brito¹, Veronica Hoyos Marulanda¹, Luis Augusto Xavier Cruz², Bernardo G. Gasperin¹, Arnaldo D. Vieira¹, Rafael Gianella Mondadori^{1,2}, Thomaz Lucia Jr^{1*}

¹Rede FiBRA, Departamento de Patologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Capão do Leão, RS, Brasil.

²Instituto de Biologia, Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

*Corresponding author: email tluciajr@gmail.com .

ABSTRACT

This study assessed morphometric traits of the ampulla of the oviducts in prepubertal gilts treated with chorionic gonadotropins. With the day of slaughter as D0, gilts were assigned to four treatments (n=8 each): control (untreated), eCG (200IU eCG on D3), eCG+hCG (1200 IU eCG on D6 plus 500IU hCG on D3), and eCG+hCG+AI (the previous treatment plus artificial insemination on D1). Blood and ampullae samples were collected at slaughter. Serum progesterone concentrations were higher for gilts treated with hCG than for those in the eCG and control treatments ($p<0.001$), but estradiol concentrations did not differ ($p>0.05$). The epithelium, muscle and lumen areas and the inner and larger ampullae diameters did not differ across treatments ($p>0.05$). Therefore, treatment with chorionic gonadotropins did not alter the ampullae morphometry of prepubertal gilts.

Keywords: eCG, gilts, hCG, oviduct

Introduction

As gilts represent a substantial proportion of the breeding inventory in pig farms (Patterson and Foxcroft 2019), treatments with chorionic gonadotropins to induce synchronized puberty and estrus in gilts are key to optimise artificial insemination (AI). The distinct endocrine profiles induced by such treatments may alter some characteristics of the female reproductive system organs.

After being deposited in the female tract, spermatozoa need to cross the uterotubal junction and the isthmus to reach the ampulla of the oviducts (Rodríguez-Martínez et al. 1990). Although the oviductal environment can be influenced by ovarian steroid hormones, infiltration of immune cells (Jiwakanon, Persson, and Dalin 2006) and presence of spermatozoa (Álvarez-Rodríguez et al. 2023), effects in gilts submitted to gonadotropin therapy are not yet completely understood. This study aimed to evaluate whether gonadotropin treatment to induce cyclicity in prepubertal gilts leads to morphometric changes in the ampullae of their oviducts.

Material and Methods

All procedures were approved by the Ethics in Animal Experimentation Committee of the Universidade Federal de Pelotas (process #39970).

Thirty-two crossbred (Landrace/Large White) prepubertal gilts with an average 130 days of age and 100 kg body weight were randomly assigned to four treatments (Figure 1). Control gilts were untreated. Considering the day of slaughter as D0, in eCG, gilts received 1200 IU eCG (Folligon, MSD Animal Health) I.M. on D3 to simulate a proestrus endocrine environment. In eCG+hCG+IA, the previous eCG+hCG treatment was followed by AI on D1, with 3×10^9 spermatozoa extended in BTS (Pursel and Johnson 1975) at 15–16°C.

At slaughter, blood samples were collected and split into duplicates. After centrifugation for 10 min at $3000 \times g$ and storage at -20°C , samples were sent to a commercial laboratory. Serum progesterone and estradiol concentrations were determined through electrochemiluminescence with Elecsys Progesterone III and Elecsys Estradiol III Cobas Assays, respectively (both from Roche Diagnostics). The kits had intra- and inter-assay CV lower than 10% and were originally designed for human serum but validated for multiple species. Three gilts (one control and two from eCG) with progesterone concentrations above 3.0 ng/mL were censored, as they may have ovulated.

The oviducts were collected at slaughter and stored at 5°C for transport. The samples were washed, dissected and preserved in a 10% formaldehyde solution, dehydrated in an

ethanol gradient, embedded in paraffin, cut transversely into 3µm sections and stained with haematoxylin and eosin. Histological sections were photographed at 40× under an optical microscope (Eclipse E200, Nikon) equipped with a trinocular camera (Moticam 5MP).

The areas of the lumen, epithelium and muscle layers, and the inner and the larger ampullae diameters were determined with ImageJ. Six samples from eCG+hCG to eCG+hCG+AI (n=3 each) were censored due to poor image quality. Thus, the final sample size consisted of 23 gilts. As the Shapiro–Wilk's test indicated lack of normality, data for serum progesterone concentrations were transformed to logarithm. All responses were compared using analysis of variance and comparisons of means with the Tukey test (Statistix 2013).

Results

The overall serum estradiol and progesterone concentrations were 48.5 ± 12.4 pg/mL and 2.9 ± 2.6 ng/mL, respectively. Progesterone concentrations (Figure 2A) for gilts in eCG+hCG and in eCG+hCG+IA were greater than for those in eCG and in the control ($p < 0.001$), but estradiol concentrations did not differ ($p > 0.05$, Figure 2B).

The epithelium, muscle and lumen areas and the inner and total larger diameter of the ampullae did not differ ($p > 0.05$) among treatments (Table 1). Thus, Figure 3 shows images from the eCG+hCG+AI treatment.

Discussion

The greater serum progesterone concentrations observed for hCG-treated gilts compared to controls and those treated only with eCG likely result from the follicle-stimulating action of eCG, compounded by the ovulation-inducing action of hCG (Knox et al. 2000). In females with increased progesterone concentration, such as those treated with eCG and hCG, the cells of the columnar pseudostratified epithelium of the ampullae are expected to be taller than in anestrus females (Juárez-Mosqueda et al. 2015). However, although the inner diameter and the epithelium and lumen areas in the ampullae of gilts in both treatments including hCG were marginally greater compared to the other treatments, these differences were not significant. That would occur because hCG may downregulate the eCG-induced expression of steroidogenic enzymes, thereby limiting the capacity for oestrogen production by initial antral follicles (Słomczyńska and Tabarowski 2001). Thus, the basal serum estradiol concentration observed across treatments may have impaired the oviductal cells to trigger oestrogen-induced responses similar to those of estrous females (McGlade et al. 2021), such as local cell

proliferation. Additionally, such response may have been influenced by the fact that the gilts in this study were destined for slaughter, unexposed to boar contact and younger than gilts showing satisfactory response to gonadotropin therapy elsewhere (Knox et al. 2000), as evidenced by the lack of observed estrus signs.

As AI is conducted during estrus, under oestrogen predominance, the presence of spermatozoa and seminal plasma proteins is tolerated in the oviducts (Álvarez-Rodríguez et al. 2023). After ovulation, under progesterone predominance, the local fluid secretion and protein production decline (Barton et al. 2020), as preparation for pregnancy (Álvarez-Rodríguez et al. 2023). Nonetheless, although the eCG+hCG+AI treatment was designed to assess effects of the presence of gametes, no effects on ampullae morphometry were observed.

Conclusion

Treatment with eCG and hCG in prepubertal gilts promoted an increase in serum progesterone concentration with no changes in the morphometry of ampullae of the oviducts. That may be due to the unchanged estradiol serum concentration.

Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil), for the financial support, and Fita Azul abattoir for the providing facilities and animals for this study.

References

- Álvarez-Rodríguez, M., J. Roca, E. A. Martínez, and H. Rodríguez- Martinez. 2023. “Mating Modifies the Expression of Crucial Oxidative-Reductive Transcripts in the Pig Oviductal Sperm Reservoir: Is the Female Ensuring Sperm Survival?” *Frontiers in Endocrinology* 14: 1042176. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1042176>.
- Barton, B. E., G. G. Herrera, P. Ananthathmakula, et al. 2020. “Roles of Steroid Hormones in Oviductal Function.” *Reproduction* 159: R125. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0189>.
- Jiwakanon, J., E. Persson, and A.-M. Dalin. 2006. “The Influence of pre- and Post-Ovulatory Insemination and Early Pregnancy on the Infiltration by Cells of the Immune System in the Sow Oviduct.” *Reproduction in Domestic Animals* 41: 455–466. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00695.x>.
- Juárez-Mosqueda, M. L., S. R. Anzaldúa Arce, I. Palma Lara, et al. 2015. “Oestrus Synchronization Treatment Induces Histomorphological Changes on the Uterine Tube Epithelium of the Gilt.” *Anatomia, Histologia, Embryologia* 44: 441–451. <https://doi.org/10.1111/ahe.12156>.
- Knox, R. V., K. W. Tudor, S. L. Rodríguez-Zas, and J. A. Robb. 2000. “Effect of Subcutaneous vs Intramuscular Administration of P.G. 600 on Estrual and Ovulatory Responses of Prepubertal Gilts.” *Journal of Animal Science* 278: 1732–1737. <https://doi.org/10.1111/rda.12524>.
- McGlade, E. A., G. G. Herrera, K. K. Stephens, et al. 2021. “Cell- Type Specific Analysis of Physiological Action of Estrogen in Mouse Oviducts.” *FASEB Journal* 35: e21563. <https://doi.org/10.1096/fj.202002747R>.
- Patterson, J., and G. Foxcroft. 2019. “Gilt Management for Fertility and Longevity.” *Animals* 9: 434. <https://doi.org/10.3390/ani9070434>.

Pursel, V. G., and L. A. Johnson. 1975. "Freezing of Boar Spermatozoa: Freezing Capacity With Concentrated Semen and a New Thawing Procedure." *Journal of Animal Science* 40: 99–102. <https://doi.org/10.2527/jas1975.40199x>.

Rodriguez-Martinez, H., L. Nicander, S. Viring, S. Einarsson, and K. Larsson. 1990. "Ultrastructure of the Uterotubal Junction in Preovulatory Pigs." *Anatomia, Histologia, Embryologia* 19: 16–36. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1990.tb00875.x>.

Słomczyńska, M., and Z. Tabarowski. 2001. "Localization of Androgen Receptor and Cytochrome P450 Aromatase in the Follicle and Corpus Luteum of the Porcine Ovary." *Animal Reproduction Science* 65: 127–134. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00225-6](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00225-6).

Statistix. 2013. Statistix 10 Analytical Software. FL, USA: Tallahassee.

List of Figures and Tables

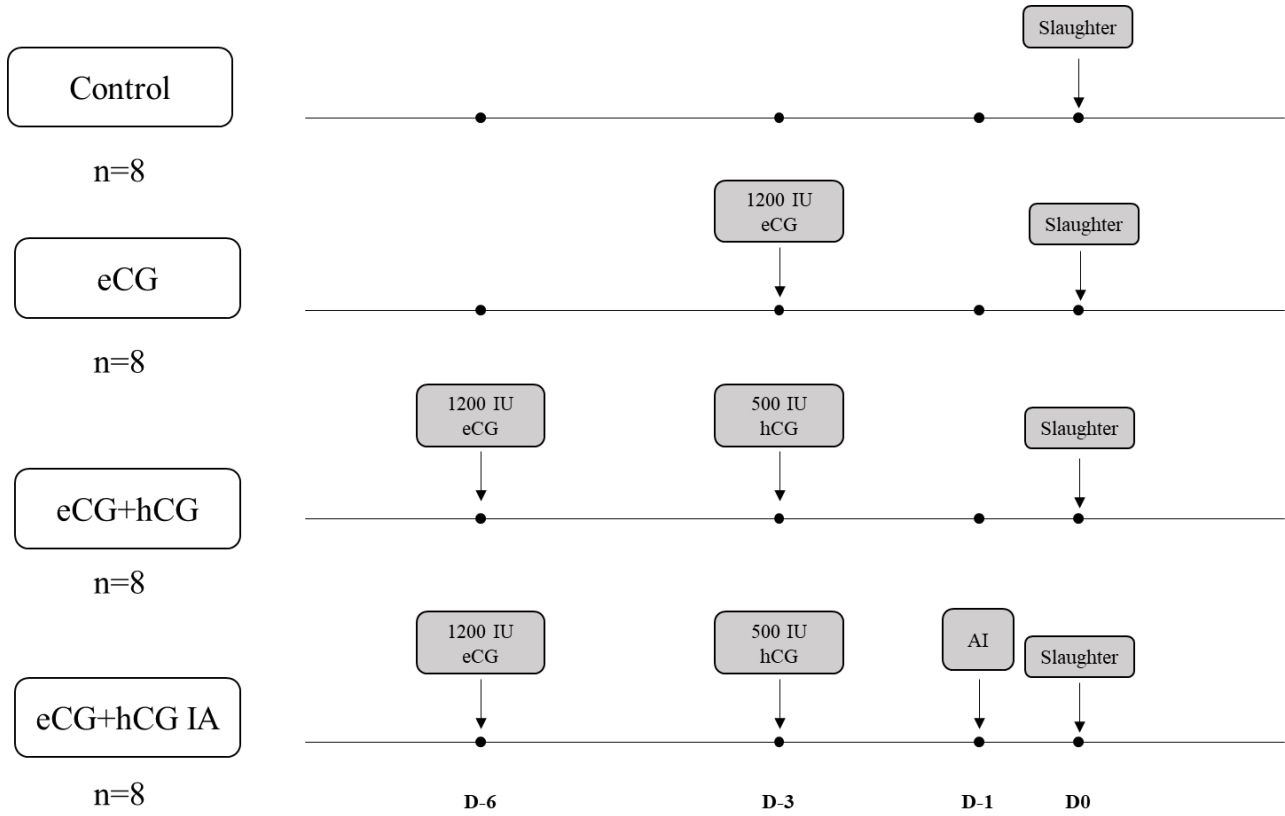


Figure 1. Experimental design: D0 = day of slaughter; AI = artificial insemination.

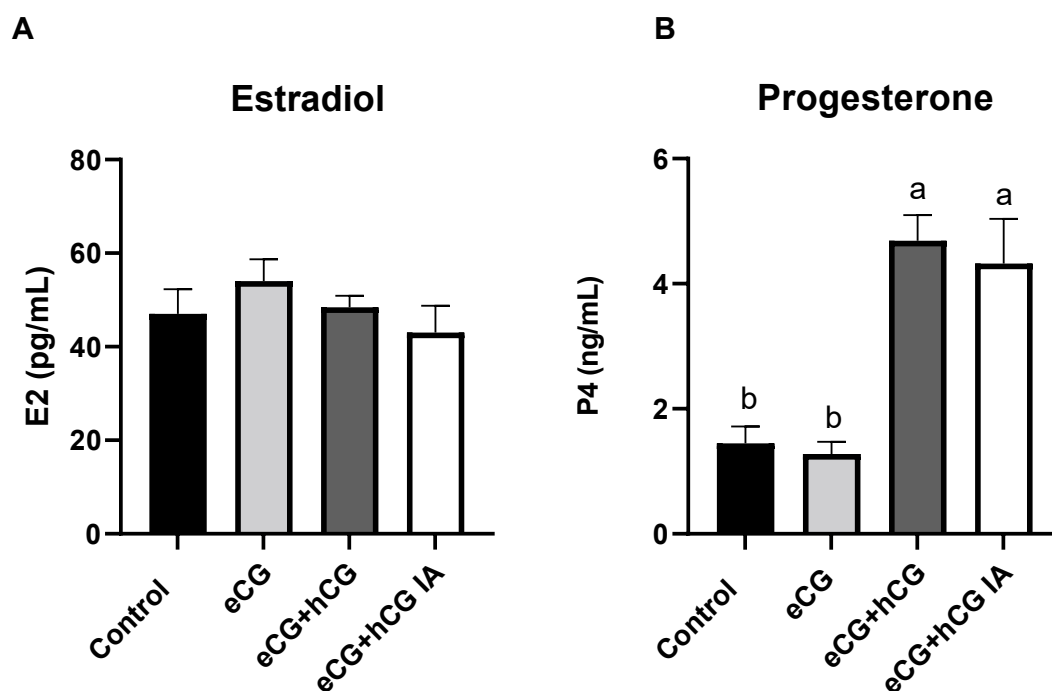


Figure 2: Serum estradiol (A) and progesterone (B) concentrations in prepubertal gilts receiving distinct treatments. Control: No treatment; eCG: 1200 IU eCG on D3; eCG+hCG: 1200 IU eCG on D6 plus 500 IU hCG on D3; eCG+hCG+AI: 1200 IU eCG on D6 plus 500 IU hCG on D3 plus artificial insemination on D1 (D0=day of slaughter). a,b Means $\pm$ SEM differ by at least $p < 0.001$.



Figure 3: Representative morphometric images of the ampulla of the oviducts. Histological section stained with haematoxylin and eosin, assessed using a 40 $\times$ objective (A): Red arrow indicates internal diameter; green arrow represents the external diameter. Epithelial (B) and smooth muscle (C) areas assessed using the threshold tool of ImageJ.

Table 1. Morphometric data of ampulla of oviducts of prepubertal gilts receiving distinct treatments

Groups	Ampulla				P-value
	Control (n=7)	eCG (n=6)	eCG+hCG (n=5)	eCG+hCG IA (n=5)	
Epithelium area (mm²)	0.6766 (±0.1459)	0.7600 (±0.1249)	0.9392 (±0.1797)	1.079 (±0.1919)	0.3068
Muscle area (mm²)	0.6989 (±0.08148)	0.8788 (±0.08148)	0.9444 (±0.05640)	0.8482 (±0.09957)	0.2191
Luminal area (mm²)	1.217 (±0.1961)	1.236 (±0.1619)	1.370 (±0.2252)	1.810 (±0.4328)	1.2170
Total larger diameter (µm)	1954.9 (±158.8)	2054.2 (±144.9)	2238.6 (±160.7)	2340.7 (±210.9)	0.3799
Inner larger diameter (µm)	1674.5 (±152.8)	1702.2 (±145.0)	1887.0 (±185.2)	2011.2 (±264.5)	0.5446

4 Considerações Finais

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitiram concluir que as leitoas tratadas com duas doses de hCG durante a fase luteal (uma aplicação em D12 e a outra em D15 do ciclo estral, sendo D0 o dia do estro anterior), foram sincronizadas com relativo sucesso após a aplicação de closprostenol sódico no D30, permitindo concentrar o estro seguinte em até seis dias de sua aplicação. Entretanto, esse mesmo grupo apresentou desempenho reprodutivo inferior no que diz respeito ao tamanho de leitegada quando comparado ao grupo controle e ao grupo tratado com eCG e hCG em D10 e D12, respectivamente. Possivelmente, a concentração mais alta de progesterona desse grupo exerceu papel importante na menor liberação de oócitos ovulados durante o tratamento.

Por último, ao se mimetizar as fases do ciclo estral em leitoas pré-puberes com o tratamento de gonadotrofinas esperava-se que haveriam mudanças morfológicas significativas nos ovidutos dessas fêmeas, especialmente nas fêmeas que foram inseminadas. Entretanto, as análises morfométricas realizadas não demonstraram haver diferenças significativas no que diz respeito às áreas de superfície de epitélio e musculatura lisa e diâmetro de lúmen e da camada muscular nos segmentos istmo e ampola. Não foi possível porém determinar se houve mudança na composição celular no que diz respeito à relação entre células secretoras e células ciliadas.

Referências

Affandi, B. Long-acting progestogens. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, vol. 16, n.2, p.169-179, 2002.

Alvarez-Rodríguez, M.; Roca, J.; Martínez, E. A.; Rodriguez-Martinez, H. Mating Modifies the Expression of Crucial Oxidative-Reductive Transcripts in the Pig Oviductal Sperm Reservoir: Is the Female Ensuring Sperm Survival? **Frontiers in Endocrinology**, v.14, p.1042176, 2023.

Bailey, D. W.; Dunlap, K. A.; Frank, J. W.; Erikson, D.W.; White, BG; Bazer, F.W.; Burghardt, R.C.; Johnson, G.A. Effects of long-term progesterone on developmental and functional aspects of porcine uterine epithelia and vasculature: progesterone alone does not support development of uterine glands comparable to that of pregnancy. **Reproduction**, v.140, n.4, p.583, 2010.

Baldessar, P. Uso de progesterona injetável de longa ação para indução de puberdade em leitoas. 2022. Dissertação (Mestrado em Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal) - Instituto Federal Catarinense. Orientador: Ivan Bianchi.

Barton, B.E.; Herrera, G.G.; Anamthakmakula, P.; Rock, J.K.; Willie, A.M.; Harris, E.A.; Takemaru, K.I.; Winuthayanon, W. Roles of steroid hormones in oviductal function. **Reproduction**, v.159, n.3, p.R125, 2020.

Bó, G. A.; De la Mata, J. J.; Baruselli, P. S.; Menchaca, A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. **Theriogenology**, v.86, n.1, p.388-396, 2016.

Cassar, G.; Kirkwood, R. N.; Poljak, Z.; Bennett-Steward, K.; Friendship, R. M. Effect of single or double insemination on fertility of sows bred at an induced estrus and ovulation. **Journal of swine health and production**. 2005 Sep 1;13(5):254-8.

D'Avila, C. A.; De Moraes, F. P.; Bohn, A. P.; Rovani, M. T.; Vieira, A. D.; Ferreira, R.; De Sousa Sales, J. N.; Baldassarre, H.; Mondadori, R. G.; Gonçalves, P. B.; Gasperin, B. G. Injectable progesterone for estrus and ovulation induction in seasonal anestrous ewes. **Livestock Science**, v.265, p.105070, 2022.

De Rensis, F.; Kirkwood, R. N. Control of estrus and ovulation: Fertility to timed insemination of gilts and sows. **Theriogenology**, v.86, n.6, p.1460-1466, 2016.

Dyck, G. W. The effect of estradiol benzoate and boar exposure on the occurrence of estrus and ovulation in the gilt. **Canadian Journal of Animal Science**, v.68, n.2, p.377-386, 1988.

Estill, C.T. Current concepts in estrus synchronization in swine. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1-9, 2000.

Estill, C. T.; Britt, J. H.; Gadsby, J. E.. Repeated administration of prostaglandin F2 α during the early luteal phase causes premature luteolysis in the pig. **Biology of reproduction**, v.49, n.1, p.181-185, 1993.

Falceto, M. V.; Suárez-Usbeck, A.; Tejedor, M. T.; Ausejo, R.; Garrido, A. M.; Mitjana, O. GnRH agonists: Updating fixed-time artificial insemination protocols in sows. **Reproduction in domestic animals**, v.58, p.571-582, 2023.

Fontana, D; Ulguim, R; Dias, A C; Feronato, C. (2015). Manejo em bandas na suinocultura. In: XVIII Congresso Abraves. P. 159-166.

Fong, H.; Zheng, J.; Kurrasch, D. The structural and functional complexity of the integrative hypothalamus. **Science**, v.382, n.6669, p.388-394, 2023.

Foxcroft, G. R.; Elsaesser, F.; Stickney, K.; Haynes, N. B.; Back, H. L. Ovarian oestrogen-dependent maturation of the LH/FSH surge mechanism during prepubertal development in the gilt. **Journal of Endocrinology**, v.101, n.3, p.371-380, 1984.

Galbraith, H. Hormones in international meat production: biological, sociological and consumer issues. **Nutrition Research Reviews**, v.15, n.2, p.293-314, 2002.

Ganmaa, D.; Sato, A. The possible role of female sex hormones in milk from pregnant cows in the development of breast, ovarian and corpus uteri cancers. **Medical hypotheses**, v.65, n.6, p.1028-1037, 2005.

Gasperin, B. G.; Freling, G. F.; Ferreira, R.; Oliveira, J. F.; Bordignon, V.; Gonçalves, P. B. Intravaginal progestagen for estrus and parturition control in sows. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.961-964, 2011.

Guthrie, H. D. Fertility after estrous cycle control using gonadotropin and prostaglandin F2 α treatment of sows. **Journal of animal science**, v.49, n.1, p.158-162, 1979.

Guthrie, H.D.; Bolt, D.J. Changes in plasma estrogen, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 α during blockade of luteolysis in pigs after human chorionic gonadotropin treatment. **Journal of Animal Science**, v.57, n.4, p.993-1000, 1983.

Guthrie, H. D.; Polge, C. Control of oestrus and fertility in gilts with accessory corpora lutea by prostaglandin analogues, ICI 79,939 and ICI 80,996. **Reproduction**, v.48, n.2, p.427-430, 1976.

Hirayama, Y.; Misumi, K.; Yoshioka, K.; Noguchi, M.; Kikuchi, K. Induction of short-term pseudopregnancy in gilts by the administration of estradiol benzoate or estradiol dipropionate to achieve ovulatory synchronization for embryo collection. **Animal Science Journal**, v.92, n.1, e13480, 2021.

Jiwakanon, J.; Persson, E.; Dalin, A. M. The influence of pre- and post-ovulatory insemination and early pregnancy on the infiltration by cells of the immune system in the sow oviduct. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, n.5, p.455-466, 2006.

Juárez-Mosqueda, M. L.; Anzaldúa Arce, S. R.; Palma Lara, I.; García Dalman, C.; Cornejo Cortes, M. A.; Cordova Izquierdo, A.; Villasenor Gaona, H.; Trujillo Ortega, M. E. Oestrus synchronization treatment induces histomorphological changes on the uterine tube epithelium of the gilt. **Anatomia, histologia, embryologia**, v.44, n.6, p.441-451, 2015.

Kaeoket, K. Study on the oestrous synchronization in gilts by using progestin altrenogest and hCG: its effect on the follicular development, ovulation time and subsequent reproductive performance. **Reproduction in domestic animals**, v.43, n.1, p.127-129, 2008.

Kauffold, J.; Beckjunker, J.; Kanora, A.; Zaremba, W. Synchronization of estrus and ovulation in sows not conceiving in a scheduled fixed-time insemination program. **Animal reproduction science**, v.97, n.1-2, p.84-93, 2007.

Knox, R. V.; Tudor, K. W.; Rodriguez-Zas, S. L.; Robb, J. A. Effect of subcutaneous vs intramuscular administration of P.G. 600 on estrual and ovulatory responses of prepubertal gilts. **Journal of Animal Science**, v.78, n.7, p.1732-1737, 2000

Komatsu, K.; Masubuchi, S. The concentration-dependent effect of progesterone on follicle growth in the mouse ovary. **Journal of Reproduction and Development**, v.63, n.3, p.271-277, 2017.

Kraeling, R. R.; Webel, S. K. Current strategies for reproductive management of gilts and sows in North America. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.6, p.1-4, 2015.

Langendijk, P.; Peltoniemi, O. How does nutrition influence luteal function and early embryo survival. **Society for Reproduction and Fertility**, n.68, p.145-158, 2013.

Lents, C. A. Review: kisspeptin and reproduction in the pig. **Animal**, v.13, n.12, p.2986-2999, 2019.

Lents, C. A.; Lindo, A. N.; Hileman, S. M.; Nonneman, D. J. Physiological and genomic insight into neuroendocrine regulation of puberty in gilts. **Domestic Animal Endocrinology**, n.73, p.106446, 2020.

Lewchalermwong, D.; Tummaruk, P.; Knox, R. V. Investigation into the variation in follicular and endocrine responses of prepubertal gilts treated with exogenous gonadotropins. **Animal reproduction science**, v.223, p.106622, 2020.

Lurette, A.; Belloc, C.; Touzeau, S.; Hoch, T.; Seegers, H.; Fourichon, C. Modelling batch farrowing management within a farrow-to-finish pig herd: influence of management on contact structure and pig delivery to the slaughterhouse. **Animal**, v.2, n.1, p.105-116.

Machado, G.; Dallanora, D. Evolução histórica dos sistemas de produção de suínos. Associação Brasileira de Criadores de Suínos. **Produção de suínos: teoria e prática**. Coordenação Técnica da Integrall Soluções em Produção Animal/Coordenação editorial. Brasília, DF. 2014.

Mallmann, A. L.; Arend, L. S.; Oliveira, G. S.; Mellagi, A. P.; Ulguim, R. R.; Bernardi, M. L.; Bortolozzo, F. P.; Knox, R. V. Effects of flush feeding strategy before breeding on reproductive performance of modern replacement gilts: impacts on ovulation rate and litter traits. **Journal of animal science**, v.98, n.6, p.1-10, 2020.

McGlade, E. A.; Herrera, G. G.; Stephens, K. K.; Olsen, S. L. W.; Winuthayanon, S.; Guner, J.; Hewitt, S. C.; Korach, K. S.; DeMayo, F. J.; Lydon, J. P.; Monsivais, D.; Winuthayanon, W. Cell-type specific analysis of physiological action of estrogen in mouse oviducts. **FASEB Journal**, v.35, n.5, e21563, 2021.

McPhee, S. R.; Doyle, M. W.; Davfs, I. F.; Chamley, W. A. Multiple use of progesterone releasing intravaginal devices for synchronisation of oestrus and ovulation in cattle. **Australian veterinary journal**, v.60, n.2, p.40-43, 1983.

Medeiros, J.; Miele, M. Sistemas de produção integrado, contratado, cooperado e independente. Associação Brasileira de Criadores de Suínos. **Produção de suínos: teoria e prática**. Coordenação Técnica da Integrall Soluções em Produção Animal/Coordenação editorial. Brasília, DF. 2014.

Murphy, B. D.; Gévry, N.; Ruiz-Cortés, T.; Coté, F.; Downey, B. R.; Sirois J. Formation and early development of the corpus luteum in pigs. **Reproduction Supplement**, v.58, p.47-63, 2001.

Noguchi, M.; Ikedo, T.; Kawaguchi, H.; Tanimoto, A. Estrus synchronization in microminipig using estradiol dipropionate and prostaglandin F2 α . **Journal of Reproduction and Development**, v.62, n.4, p.373-378, 2016.

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, n.4, p.421-427, 2010.

Paterson, A. M.; Pearce, G. P.; Foxcroft, G. R.; Reed, H. C. Reproductive performance of gilts induced into puberty with oestradiol benzoate or a combination of pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin. **Animal Science**, v.38, n.1, p.121-128, 1984.

Patterson, J.; Foxcroft, G.. Gilt Management for Fertility and Longevity. **Animals**, v.9, n.7, p.434, 2019

Pugliesi, G.; Bisinotto, D. Z.; Mello, B. P.; Lahr, F. C.; Ferreira, C. A.; Melo, G. D.; Bastos, M. R. A novel strategy for resynchronization of ovulation in Nelore cows using injectable progesterone (P4) and P4 releasing devices to perform two timed inseminations within 22 days. **Reproduction in Domestic Animals**, v.54, n.8, p.1149-1154, 2019.

Pursel, V. G.; Johnson, L. A.. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of Animal Science**, v.40, n.1, p.99-102, 1975.

Orlowski, M.; Sarao, M. S. Physiology, Follicle Stimulating Hormone. In: StatPearls. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing, 2025.

Qin, L. Q.; Wang, P. Y.; Kaneko, T.; Hoshi, K.; Sato, A. Estrogen: one of the risk factors in milk for prostate cancer. **Medical hypotheses**, v.62, n.1, p.133-142, 2004.

Quirino, M.; da Rosa Ulguim, R.; Bernardi, M. L.; Pereira, V. N.; Magoga, J.; Gianluppi, R. D.; Mellagi, A. P.; Gasperin, B. G.; Bortolozzo, F. P. Follicular dynamic and reproductive performance of gilts submitted to estrous cycle synchronization using two different progestogen sources. **Theriogenology**, v.158, p.31-38, 2020.

Rodriguez-Martinez, H.; Nicander, L.; Viring, S.; Einarsson, S.; Larsson, K. Ultrastructure of the uterotubal junction in preovulatory pigs. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.19, n.1, p.16-36, 1990.

Rampacek, G. B.; Schwartz, F. L.; Fellows, R. E.; Robison, O. W.; Ulberg, L. C. Initiation of reproductive function and subsequent activity of the corpora lutea in prepuberal gilts. **Journal of Animal Science**, v.42, n.4, p.881-887, 1976.

Rohe, H. J.; Ahmed, I. S.; Twist, K. E.; Craven, R. J. PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1): a targetable protein with multiple functions in steroid signaling, P450 activation and drug binding. **Pharmacology & therapeutics**, v.121, n.1, p.14-19, 2009.

Sell-Kubiak, E.; Knol, E. F.; Mulder, H. A.; Pszczola, M. Unraveling the actual background of second litter syndrome in pigs: based on Large White data. **Animal**, v.15, n.2, p.100033, 2021.

Senger, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 3.ed. Pullman, WA: Current Conceptions, 2015, 381 p.

Skorupskaite, K.; George, J. T.; Anderson, R. A. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. **Human Reproduction Update**, v.20, n.4, p.485-500, 2014.

Słomczyńska, M.; Tabarowski, Z. Localization of androgen receptor and cytochrome P450 aromatase in the follicle and corpus luteum of the porcine ovary. **Animal Reproduction Science**, v.65, n.1-2, p.127-134, 2001.

Soede, N. M.; Raaphorst, C. J.; Bouwman, E. G.; Kirkwood, R. N. Effects of injection of hCG during the estrous cycle on follicle development and the inter-estrous interval. **Theriogenology**, v.55, n.4, p.901-909, 2001.

Soede, N. M.; Bouwman, E. G.; Langendijk, P.; Van Der Laan, I.; Kanora, A.; Kemp, B. Follicle development during luteal phase and altrenogest treatment in pigs.

Reproduction in domestic animals, v.42, n.3, p.329-332, 2007.

Ten Haff, W.; Thacker, P. A.; Kirkwood, R. N. Effect of injecting gonadotrophins during the luteal phase of the estrous cycle on the inter-estrus interval of gilts.

Canadian journal of animal science, v.82, n.3, p.457-459, 2002.

Tomikawa, J.; Homma, T.; Tajima, S.; Shibata, T.; Inamoto, Y.; Takase, K.; Inoue, N.; Ohkura, S.; Uenoyama, Y.; Maeda, K.; Tsukamura, H. Molecular characterization and estrogen regulation of hypothalamic KISS1 gene in the pig. **Biology of**

Reproduction, v.82, n.2, p. 313-319, 2010.

Ulguim, R. R.; Mallmann, A. L.; Gasperin, B. G.; Bernardi, M. L.; Wentz, I.; Mellagi, A. P.; Bortolozzo, F. P. Effects of intravaginal devices containing different dosages of medroxyprogesterone acetate for the control of the estrous cycle in gilts. **Animal**

reproduction science, v.210, p.106200, 2019.

Wang, Z.; Liu, B. S.; Wang, X. Y.; Wei, Q. H.; Tian, H.; Wang, L. Q. Effects of altrenogest on reproductive performance of gilts and sows: A meta-analysis. **Animal reproduction science**, v.197, p10-21, 2018.

Wentz, I.; Gava, D.; Bortolozzo, F. P. Hormonioterapia como ferramenta no manejo reprodutivo dos suínos. In: **Anais do XIII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos** (Florianópolis, Brasil) 2007 (pp. 139-154).

Werlang, R. F.; Argenti, L. E.; Fries, H. C.; Bernardi, M. L.; Wentz, I.; Bortolozzo, F. P. Effects of Breeding at the Second Oestrus or After Post-Weaning Hormonal Treatment with Altrenogest on Subsequent Reproductive Performance of Primiparous Sows. **Reproduction in domestic animals**, v.46, n.5, p818-823, 2011.

Wijesena, H. R.; Nonneman, D. J.; Rohrer, G. A.; Lents, C. A. Relationships of genomic estimated breeding values for age at puberty, birth weight, and growth during development in normal cyclic and acyclic gilts. **Journal of Animal Science**, v.101, skad258, 2023.

Wijesena, H. R.; Keel, B. N.; Nonneman, D. J.; Cushman, R. A. ; Lents, C. A. Clustering of multi-tissue transcriptomes in gilts with normal cyclicity or delayed puberty reveals genes related to pubertal development. **Biology of Reproduction**, v.110, n.2, p.261-274, 2024.

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, n.4, p721-732, 1988.

Ziecik, A. J.; Klos, J.; Przygodzka, E.; Milewski, R.; Jana, B. Aberrant effects of altrenogest and exposure to exogenous gonadotropins on follicular cysts appearance in gilts. **Theriogenology**, v.89, p.250-254, 2017.

Anexos



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO - MEC
Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – Campus Araquari

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO INSTITUTO FEDERAL
CATARINENSE, CÂMPUS ARAQUARI**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Marcadores Metabólicos, Hormonais e genéticos associados à puberdade e ao anestro em leitoas e estratégias para a indução da puberdade e controle da ciclicidade em fêmeas suínas” de protocolo número “ 347/2020 ” sob a responsabilidade de “Ivan Bianchi” que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no 11.794 de 08 de Outubro de 2008, do Decreto 6.899 de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais IFC-Araquari em reunião de “25/11/2020”.

Vigência do projeto:	02/01/2021 a 30/12/2025
Espécie/Linhagem:	Suínos / Hiper-Pamplona (Landrace X Large White)
Nº de Animais:	3210
Peso/Idade:	80kg a 250kg / 150 a 700 dias
Sexo:	3210 fêmeas
Origem:	Unidade de quarto sítio e unidades produtoras de leitões da agroindústria Pamplona Alimentos S/A

OBS:

Em caso de não execução do projeto, deve ser solicitada a retirada do mesmo em até 60 dias após a emissão do parecer conforme orientação disponível em <http://araquari.ifc.edu.br/ceua/>
60 dias após a execução do projeto, deve ser submetido relatório final para avaliação do comitê conforme regimento do CEUA Artigo 25 §4:

§ 4º. O proponente de um projeto/protocolo deve, ao final da execução do mesmo, encaminhar à CEUA/IFC o relatório final contendo informações básicas baseando-se nos itens descritos no formulário de submissão. O não envio de relatórios de projetos/protocolos já concluídos implicará na não aprovação de novos projetos/protocolos do mesmo proponente.

Elizabeth Schwegler
Médica Veterinária (CRMV/RS 10058)
Prof. EBTT (Siape nº 1046884)

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais do IFC - Campus Araquari
Portaria nº 247/2018/Reitoria



INSTITUTO FEDERAL
CATARINENSE
Campus Araquari

BR 280, Km 27 – Caixa Postal 21
Araquari/SC – CEP: 89.245-000
(47) 3803-7200 / ifc@ifc-araquari.edu.br