

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO POR ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER DA VASCULARIZAÇÃO
DO CORPO LÚTEO EM ÉGUAS RECEPTORAS DE EMBRIÕES**

Autor: Felipe Augusto Boudoux Martins Sales

Orientador: Prof. Dr. Paulo Fernandes de Lima

Recife, 2016

Aluno: Felipe Augusto Boudoux Martins Sales	
CPF: 068.495.884 - 86	Ano de Nascimento: 1987
Nível: Mestrado (X) Doutorado ()	
Bolsa: Capes () CNPq (X) FACEPE () Outro ()	
Projeto Financiado: CNPq () FACEPE () BNB () FINEP () Outro ()	
Título do Projeto: AVALIAÇÃO POR ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER DA VASCULARIZAÇÃO DO CORPO LÚTEO EM ÉGUAS RECEPTORAS DE EMBRIÕES	
Linha de Pesquisa Cadastrada no PPGCV: Biotecnologia Aplicada a Reprodução	
Descrição do Projeto: Objetivou-se nesse trabalho avaliar o melhor dia para realização da inovulação, através do ultrassom doppler as características morfológicas do corpo lúteo (CL) e da perfusão sanguínea pela análise dos pontos de pixels, comparando com a concentração de Progesterona (P4) no dia da inovulação.	
Equipe do Projeto: Felipe Augusto Boudoux Martins Sales CPF: 06849588486; Marlon Vasconcelos de Azevedo Nathália Matos Vasconcelos	
Matrícula inicial (discentes de graduação)	
Orientador: Paulo Fernandes Lima	
Co-orientador(es): Cláudio Coutinho Bartolomeu	
Aluno(s) de PG – MS: 1	
Aluno(s) de PG – DR: 2	
Aluno(s) de Graduação: 0	

FELIPE AUGUSTO BOUDOUX MARTINS SALES

**AVALIAÇÃO POR ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER DA VASCULARIZAÇÃO
DO CORPO LÚTEO E DO ÍNDICE DE PREENHEZ EM ÉGUAS RECEPTORAS DE
EMBRIÕES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência Veterinária, como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Drº. Paulo Fernandes de Lima/UFRPE

Orientador

Profº. Drº. Marcos Antonio Lemos de Oliveira/UFRPE

Examinador

Profº. Drº. Claudio Coutinho Bartolomeu/UFRPE

Examinador

Drª. Joana D'arque da Rocha Alves/UFRPE

Suplente

Tudo passa...

Todas as coisas na Terra passam.

Os dias de dificuldade passarão...

Passarão, também, os dias de amargura e solidão.

As dores e as lágrimas passarão.

As frustrações que nos fazem chorar... um dia passarão.

A saudade do ser querido que está longe, passará.

Os dias de tristeza...

Dias de felicidade...

São lições necessárias que, na Terra, passam, deixando no espírito imortal as experiências acumuladas.

**Se, hoje, para nós, é um desses dias,
repleto de amargura, paremos um instante.**

**Elevemos o pensamento ao Alto
e busquemos a voz suave da Mãe amorosa,
a nos dizer carinhosamente: 'isto também passará'**

**E guardemos a certeza pelas próprias dificuldades já superadas que não há mal que dure para sempre,
semelhante a enorme embarcação que, às vezes, parece que vai soçobrar diante das turbulências de gigantescas ondas.**

**Mas isso também passará porque Jesus está no leme dessa Nau
e segue com o olhar sereno de quem guarda a certeza de que a
agitação faz parte do roteiro evolutivo da Humanidade
e que um dia também passará.**

**Ele sabe que a Terra chegará a porto seguro
porque essa é a sua destinação.**

**Assim, façamos a nossa parte o melhor que pudermos,
sem esmorecimento e confiemos em Deus,
aproveitando cada segundo, cada minuto que, por certo, também passará.**

Tudo passa...

exceto Deus.

Deus é o suficiente!

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Agradeço a realização deste trabalho e a todos que participaram dessa caminhada.

A Deus, pela oportunidade de viver e poder melhorar a cada dia, crescendo com o enfrentamento dos obstáculos da vida. A Nossa Senhora, pelos auxílios nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Carmelo e Lúcia, pelo amor, educação e apoio. Aos meus irmãos, Camilla e Matheus, sem os quais não estaria aqui, pois esses dois são meu alicerce. A clarinha e Lucas meus irmãos mais novos. Aos meus primos Diego, Vinícius e meu tio Jorge e a todos da minha família que sempre torceram, me apoiaram e desejaram o meu sucesso.

A minha namorada, Cristiane de Melo Vasconcelos, pelo amor, dedicação e apoio. Pela paciência e colaboração nos momentos mais difíceis nesses dois anos de mestrado. E aos meus sogros Sérgio e Simone, por torcerem sempre por mim e por terem me dado meu maior presente.

A meu orientador, Profº. Drº. Paulo Fernandes de Lima, pela oportunidade e confiança de realizar o mestrado com uma pessoa tão ilustre e dedicada a ajudar os alunos, amigos e colegas.

Ao meu amigo e orientador da vida, Profº. Drº. Claudio Coutinho Bartolomeu, pois desde a minha graduação é um pai para mim e para vários alunos, que o buscam nos momentos mais difíceis e sem esperar nada em troca realiza de bom grado o seu papel de educador, obrigado por tudo professor.

Ao Profº. Drº. Marcos Antonio Lemos de Oliveira pela amizade construída nesses dois anos de mestrado, onde pude conviver e assim observar a pessoa generosa e companheira que o senhor é, com sua fama do Marcos Bocão, mas que na verdade é uma pessoa ímpar, obrigado pela oportunidade de participar da seleção de doutorado, pois se não fosse o senhor não sei se o faria.

E agradecer aos amigos de dia a dia e de pós-graduação, pelo companheirismo e auxílio nos momentos difíceis, especialmente a Paulo Póvoas e Wilton Arruda que são desde minha graduação dois irmãos de coração para mim. Agradeço também aos amigos Dinamérico Júnior, Eduardo Melo, Rodrigo Novaes, Felipe Ferreira, Guilherme Vêras, Adilson, Elaine, Mariana, Helder Melo, André Mariano, Igor Nery e tantos amigos que são além disso colegas de profissão.

Agradeço a Marlon Vasconcelos e Nathália Vasconcelos, que me abriram as portas da sua casa, me receberam, me ajudaram tanto e que sem os quais não teria terminado o mestrado. Obrigado por tudo e parabéns pela chegada de Marília.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, Joana D'arque, Alcir Loureiro (Presidente benemérito da AFUNDOM), Dona Sônia e a irmã. Também aos tratadores dos animais do Hospital Veterinário: Marquinhos, Severino, Leo e Manoel.

A FACEPE pela concessão da bolsa de estudo. Agradeço de forma especial a minha Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) onde fiz minha graduação e agora o curso de mestrado.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CL – Corpo Lúteo

CH – Corpo Hemorrágico

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina

LH – Hormônio Luteinizante

P4 – Progesterona

PGF2 α – Prostaglandina

PV – Perfusão Vascular

PSI – Puro Sangue Inglês

TEE – Transferência de Embrião Equina

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	9
2	OBJETIVOS.....	11
2.1	GERAIS.....	11
2.2	ESPECÍFICOS.....	11
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1	CICLO ESTRAL.....	11
3.2	DINÂMICA FOLICULAR E ENDOCRINOLOGIA DA REPRODUÇÃO...	15
3.3	FORMAÇÃO E COMPOSIÇÃO DO CL.....	21
3.4	AVALIAÇÃO DO CL COM ULTRASSOM DOPPLER COLORIDO.....	28
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	29
5	ARTIGO CIENTÍFICO.....	38

RESUMO

Objetivou-se nesse trabalho avaliar o melhor dia para realização da inovulação, através do ultrassom doppler as características morfológicas do corpo lúteo (CL) e da perfusão sanguínea pela análise dos pontos de pixels, comparando com a concentração de Progesterona (P4) no dia da inovulação. Atualmente, além das características morfoecogênicas obtidas por imagens no modo-B, é possível avaliar mudanças na hemodinâmica uterina e ovariana durante todo o ciclo estral e ao longo da gestação por meio da ultrassonografia colorida Doppler. A íntima relação entre a função secretora do CL e a perfusão sanguínea luteal durante o diestro e a gestação pode auxiliar na seleção de receptoras de embriões. Os grupos do experimento foram divididos de acordo com o dia de inovulação G1(dia 3), G2(dia 4), G3(dia 5) e G4(dia 6) utilizando no experimento 30 éguas receptoras mestiças, os animais foram selecionados aleatoriamente e avaliados apenas no dia da inovulação. As características examinadas pós ovulação foram tônus, morfoecogenicidade e vascularização do útero, o diâmetro e área do corpo lúteo, vascularização objetiva (concentração de pixels) e vascularização subjetiva. Também foram coletadas amostras de sangue para determinar a concentração sérica de progesterona. Foi encontrada uma alta correlação entre a concentração sérica de P4, a vascularização objetiva e a vascularização subjetiva do CL, indicando que a avaliação da receptora utilizando a ferramenta do ultrassom doppler aumenta a segurança na seleção da receptora.

Palavras-chave: corpo lúteo, progesterona, doppler colorido.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the best day to perform the embryo transfer, using ultrasound Doppler morphological characteristics of the corpus luteum (CL) and blood perfusion by analyzing the points of pixels compared to the concentration of progesterone (P4) on the day of embryo transfer. Currently, in addition to morfoecogênicas characteristics obtained by the B-mode images, it is possible to evaluate changes in the uterine hemodynamics and ovarian throughout the estrous cycle and during pregnancy by Doppler color ultrasound. The intimate relationship between the secretory function of the CL and luteal blood perfusion during diestrus and pregnancy may help to select embryos to recipients. This work was divided into study according to the day of inovulação G1 (day 3), G2 (4th), G3 (5th) and G4 (6th) using

in the experiment 30 mares crossbred receptor, the animals were selected randomly and evaluated only on the day of embryo transfer. The post ovulation characteristics examined were tone, morphoechogenicity and vascularization of the uterus, the cervix tone, diameter and corpus luteum area, objective vascularization (concentration of pixels) and vascularization subjective. Also, blood samples were taken to determine the serum concentration of progesterone. a high correlation between the serum concentration of P4 was found, the objective and the subjective vascularization vascularization of CL, indicating that the evaluation of the receiver using the Doppler ultrasound tool increases security in the selection of the recipient.

Keys works: Corpus luteum, progesterone, color doppler.

INTRODUÇÃO

O complexo do agronegócio equino no Brasil movimenta cerca de R\$ 7,5 bilhões e gera cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos. O equino, no aspecto econômico, desempenha as funções de sela, carga e tração. No aspecto social, a partir da segunda metade do século XX, destacam-se as atividades de esportes e lazer, como a equoterapia para tratamento de portadores de dificuldades na área cognitiva, psicomotora e sócio afetiva (LIMA et al., 2006).

A maior população brasileira de equinos encontra-se na região Sudeste (24,4%), seguida da região Nordeste (24,3%), de acordo com a pesquisa Produção da Pecuária Municipal (PPM) em 2011. Segundo a mesma pesquisa, o efetivo de equinos era de 139.111 em Pernambuco, representando 2,5% de participações no efetivo do País (IBGE, 2013).

Visando um maior aproveitamento e intensificação do ritmo do melhoramento genético e a eficiência reprodutiva em equinos, criou-se a necessidade da utilização de biotecnologias reprodutivas, com o objetivo de suprir a demanda existente em relação a cavalos com alto potencial genético, nos sistemas de produção equina (MACHADO, 2002).

A primeira transferência de embriões equinos (TEE) onde se obteve sucesso foi realizada no Japão por Oguri & Tsutsumi (1972). Em 1986 foi iniciado o uso da técnica no Brasil, no estado de São Paulo, e foram realizados com sucesso na raça Mangalarga (FLEURY, 1998b). Na raça Mangalarga Marchador, a técnica foi reconhecida e aceita pelo seu Conselho Deliberativo Técnico em 1995 e, desde então, tem sido muito utilizada (CAIADO et al., 2005,

2000). A transferência de embriões na espécie equina vem sendo a solução mais utilizada para aumento do número de produtos por fêmea por ano (SQUIRES et al., 2003).

Em um levantamento realizado estimou-se que 41.652 coletas de embrião foram realizadas no mundo em 2010, um crescimento de 13% em relação ao ano anterior e 42% a mais do que em 2008, mostrando claramente um aumento da utilização da técnica. O Brasil passou a ocupar o primeiro lugar com 43% do número de embriões transferidos, sendo que Argentina (29%) e EUA (19%) ocupam a segunda e terceira colocação, respectivamente (STROUD e CALLESEN, 2012).

No cavalo, a mudança do fotoperíodo é considerada a principal responsável pelo ritmo circanual reprodutivo (NAGY; GUILLAUME; DAELS, 2000), garantindo que o nascimento ocorra na primavera e verão. A mudança no período de luz diário é um sinal ambiental codificado pelo olho para um sinal endócrino na pineal, que em resposta à escuridão irá secretar melatonina (NAGY; GUILLAUME; DAELS, 2000).

Éguas são geralmente animais poliétricos estacionais com atividade ovulatória relacionada aos dias longos e noites curtas (HAFEZ e HAFEZ; 2000). O fotoperíodo não é, entretanto, o único responsável por esta regulação, tendo outros fatores tais como idade, status reprodutivo, nutrição, condição corporal e temperatura, influência na atividade reprodutiva (SESSIONS et al., 2004). Uma proporção de animais continua ciclando ao longo de todo o ano (AURICH, 2011) podendo produzir um potro em qualquer época (HAFEZ e HAFEZ, 2000), sendo essa atividade reprodutiva no período esperado de anestro reportada por vários grupos (FITZGERALD e MCMANUS, 2000) e o motivo de sua ocorrência não é completamente compreendido.

Acredita-se que a seleção da criação também auxilia nessa diminuição da sazonalidade da atividade reprodutiva, pois a gestação deve ocorrer mais cedo na estação de monta, para tornar possível a entrada dos potros em competição precocemente. Nas raças de competição, cerca de 30% das éguas apresentam ciclos ovulatórios ao longo de todo o inverno (AURICH, 2011).

Manutenção e gestão de éguas receptoras é a maior despesa recorrente de um programa de transferência de embriões (TE). No entanto, apesar das tentativas para selecionar os destinatários adequados com base na data da ovulação, tônus uterino e cervical (CARNEVALE et al., 2000) nem todos os embriões de boa qualidade irão desenvolver em uma gestação viável depois da transferência. Embora a qualidade do embrião seja claramente um contribuinte

importante para prenhez, e em certa medida é influenciado pela escolha do garanhão e seleção e gestão da égua doadora (HENDRIKS et al, 2015), os aspectos do manejo e de seleção das éguas receptoras, podem também ser refinados ou ajustados em um esforço para melhorar as taxas de prenhez. Atualmente, as receptoras são selecionadas para receber um embrião com base na data da ovulação, tônus uterino e cervical, e ausência de qualquer anormalidade durante a avaliação ultra-som modo B do trato reprodutor.

OBJETIVOS

2.1 Gerais

Determinar as qualidades da avaliação modo Doppler para seleção de receptoras de embrião.

2.2 Específicos

Descrever a relação entre as concentrações de P4 e as características de Útero e CL como: dimensões e perfusão sanguínea; de receptoras de embrião avaliadas no momento da inovulação.

REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ciclo Estral

Segundo Hafez (2004) entre as espécies domésticas a égua é a que apresenta maior variação no ciclo estral, dependendo do local de criação ela pode ciclar o ano todo com variações nas taxas de fertilidade, entrar em anestro ou mesmo ciclar normalmente o ano todo (regiões mais próximas dos trópicos). As fases são, fase ovulatória que corresponde à estação ovulatória, a transição de outono, o anestro e a fase de transição de primavera (AURICH, 2011).

O caráter poliétrico estacional de um grande número de animais determina uma mudança do ciclo estral e do perfil hormonal ao longo do ano. Nos animais que são verdadeiramente poliétricos estacionais, quatro fases distintas são detectadas, com características hormonais e ovarianas específicas (SHARP, 2011).

O ciclo estral da égua tem duração média de 21 a 22 dias, com variação de 19 a 25 dias. Consistindo de 14 dias de diestro e 7 dias de estro, fase sexualmente receptiva. Diversos fatores ambientais como disponibilidade de alimento, luminosidade e o clima afetam as atividades ovarianas através do eixo hipotálamo-hipofisário. Vários aspectos da endocrinologia

reprodutiva da égua foram tão surpreendentes para os primeiros pesquisadores que eles hesitaram em publicar suas descobertas (ALEXANDER, 1996).

Define-se ciclo estral como o período entre duas ovulações que são acompanhadas por sinais de estro e concentrações de progesterona plasmática menor que 1 ng/ml (BLANCHARD, 2003).

O ciclo estral possui duas fases distintas tanto fisiológica como comportamental. A fase folicular ou estro é altamente variável entre ciclos e entre éguas, e dura entre 5 e 9 dias e manifesta-se a receptividade ao macho. A intensidade do estro geralmente aumenta próximo à ovulação, quando o folículo dominante tem diâmetro máximo, o útero se encontra heterogêneo e a concentração máxima de estradiol (um a três dias antes da ovulação) ocorre, na ausência da progesterona (MCCUE; SCOGGIN; LINDHOLM, 2011). O comportamento de estro pode se prolongar até um a dois dias após a ovulação (BERGFELT, 2009).

O diestro (fase luteal), que significa um período de repouso entre dois períodos de estro (LOFSTEDT, 2011), é menos variável em sua duração, tendo em média de 14 a 16 dias (BERGFELT, 2009), sendo extremamente curto em relação às outras espécies (LOFSTEDT, 2011).

A fase conhecida como anestro se caracteriza por ovários pequenos e inativos (THOMPSON, 2011), apesar de algumas éguas continuarem a mostrar sinais de estro durante este período (KING, 2011). Os folículos são menores do que 20mm, as concentrações de estradiol são basais, não existe corpo lúteo e por isso as concentrações de progesterona não excedem 1ng/mL (KING, 2011). Caracteristicamente o conteúdo hipotalâmico de GnRH no inverno é menor do que durante o verão (HART et al., 1984).

Os animais no período de transição para o anestro e para a estação ovulatória apresentam períodos de cios irregulares com duração de semanas a meses, sendo variáveis (GINTHER, 1992). Entretanto estas duas fases diferem marcadamente no ambiente hormonal e fatores que disparam seu início (KING, 2011).

Segundo Dukes (1993), Allen (1994) e Reece (1996) a égua ovula cerca de 24 h antes do final do estro, já Arruda (1990) relata que o período pode variar de 24 a 48 horas antes do fim do estro.

A transição de outono erroneamente considerada o oposto da transição de primavera, envolve uma série de características que a tornam peculiar, sendo mais longa do que a transição de primavera. Aparentemente a primeira alteração para início desta fase ocorre no ovário, enquanto na transição de primavera ela ocorre no eixo hipotálamo – hipófise – gonadal. A última ovulação da estação não pode ser considerada como referência para início do anestro como frequentemente ocorre, uma vez que a égua pode não estar ovulando e não se encontrar em anestro (KING, 2011).

Como características inerentes a esta fase, podem ser citadas alterações na função luteal como seu prolongamento ou encurtamento e na fisiologia folicular com crescimento folicular anovulatório, folículos hemorrágicos e estro silencioso (WEEDMAN et al. 1993).

De acordo com King et al. (2010), afirma-se que a função luteal é comprometida durante o outono, sendo as concentrações de progesterona menores. E a atividade prolongada do corpo lúteo ocorre devido a uma falha na liberação de $\text{PGF2}\alpha$ no momento da esperada luteólise. As concentrações de progesterona dos ciclos a partir do solstício de verão gradualmente vão declinando (KING et al., 1988), apesar do corpo lúteo (CL) não sofrer alteração de tamanho e de aspecto ultrassonográfico (KING et al., 1993).

Geralmente as éguas são monovulatórias, e esta característica permanece em animais menos domesticados, sendo as duplas ovulações pouco frequentes (GINTHER et al., 2001). Em éguas domesticadas, as taxas de dupla ovulação variam de 7 a 25% e são geralmente relacionadas a diversos fatores tais como raça, idade, status reprodutivo, manipulação farmacológica do ciclo estral e indivíduo. Em Pôneis sua frequência é de cerca de 2% a 3% enquanto em Puro Sangue Inglês (PSI) varia entre 15 a 25% (GINTHER, 1992).

O padrão regular do ciclo estral baseia-se no equilíbrio entre os hormônios produzidos pela glândula pineal, hipotálamo, hipófise, ovários e endométrio. As células neurosecretoras no hipotálamo produzem hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Os axônios dessas células projetam para o espaço perivascular na eminência mediana na origem da haste hipofisária e episodicamente libera GnRH no hipotálamo-hipofisário (Hipotálamo-pituitária) sistema porta, que transporta o hormônio da hipófise anterior. O GnRH estimula a síntese e liberação das gonadotrofinas FSH e LH da glândula pituitária anterior. Esses hormônios entram na circulação sistêmica, sendo o FSH responsável pelo recrutamento folicular, enquanto que o LH é responsável pela maturação folicular e luteinização do corpo lúteo (BLANCHARD, 2003).

O ciclo estral ou intervalo interovulatório se inicia após a ovulação acompanhada de estro e termina com a próxima ovulação acompanhada de estro (BEG e BERGFELT, 2011), tendo uma duração média na primavera e verão de 21 (MCCUE; SCOGGIN; LINDHOLM, 2011) a 22 dias (HAFEZ e HAFEZ, 2000). A raça e o status reprodutivo afeta a duração do ciclo estral, sendo que as raças Pônei têm ciclo estral dois dias mais longo (AURICH, 2011) e éguas em lactação apresentam um ciclo estral médio de $21,2 \pm 1,8$ dias comparado com $22,8 \pm 1,4$ dias em não lactantes (HEIDLER et al., 2004).

As diversas mudanças cíclicas que ocorrem na formação de novos vasos e de tecidos são muito complexas e interagem entre si formando uma rede de reações mediadas por enzimas e proteínas que realizam essas funções. Portanto, como resultado dessas mudanças cíclicas uma angiogênese distinta pode ser observada durante a maturação do folículo e formação do corpo lúteo seguido de regressão vascular durante luteólise e atresia folicular (PLENDL 2000).

Sob condições de estresse os fatores liberadores hormonais são alterados influenciando a função reprodutiva através dos três níveis do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, no hipotálamo inibindo a secreção do GnRH, na hipófise interferindo, com o GnRH, na liberação do FSH e LH e nas gônadas alterando o efeito estimulatório das gonadotrofinas na secreção de esteróides sexuais (SANTOS, 2003).

A melatonina, hormônio produzido a noite pela pineal, parece ser o intermediário entre a percepção do fotoperíodo e a resposta hipotalâmica-hipofisária na égua. A glândula pineal é responsável pela síntese e secreção de melatonina (Nacetil 5-metoxitriptofano) a partir do aminoácido triptofano presente na circulação. A melatonina é um hormônio que, nos animais que se acasalam durante fotoperíodos longos, exerce um efeito antigonadal nos ovários, através da inibição da liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (TAROUÇO, 2006).

Demonstrou-se que o fotoperíodo pode afetar a reprodução dos mamíferos, enquanto que os dias longos estimulam os dias curtos inibem a ocorrência de estro nas espécies que se acasalam na primavera e no verão (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O mecanismo de controle do fotoperíodo é desencadeado por meio dos raios solares (fótons) que incidem sobre a retina ocular estimulando seus receptores (rodopsina) que enviam mensagens através do nervo óptico e conexões na base do cérebro para o gânglio cervical superior e então para a glândula pineal, iniciando os eventos cerebrais onde também está envolvido o hipotálamo, hipófise anterior e finalmente os ovários (TAROUÇO, 2006).

3.2 Dinâmica Folicular e endocrinologia da reprodução da égua

A égua possui vários aspectos da endocrinologia reprodutiva e da gestação que são únicos (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Na égua, as gonadotrofinas LH e FSH são considerados para estar sob o controle apenas do GnRH. Até agora não há evidência que exista no cavalo um fator específico de liberação da FSH. Na égua, pulsos hipotalâmicos GnRH são seguidos por pulsos de LH a partir da pituitária e mais de 80% de pulsos de LH são acompanhados por pulsos de FSH (ALEXANDER e IRVINE, 1987).

Os pulsos de GnRH mudam de frequência de acordo com a fase do ciclo estral, e é baixa durante a fase lútea com um intervalo de pulsos de GnRH de aproximadamente 120 min. No dia da ovulação, o intervalo de pulsos de GnRH dura cerca de 30 min. A liberação hipotalâmica de GnRH é modulada por mecanismos de feedback esteroides. No entanto, a existência de receptores de esteroides sobre os neurônios GnRH não foi comprovada no cavalo até agora. Portanto, os mecanismos de feedback são mediados por áreas cerebrais superiores. No cavalo, o sistema endógeno opioidérgico é ativado pela progesterona em conjunto com o estradiol. Durante a fase lútea, o sistema opioidérgico tem a função de inibir GnRH hipotalâmico e subsequente liberação de LH hipofisário, enquanto que durante a fase folicular eles são inativos, permitindo um aumento na secreção de LH (AURICH et al., 1995).

As células gonadotróficas estão localizadas no *pars distalis* bem como no *pars tuberalis* da pituitária equina. Subconjuntos de gonadotróficos que armazenam e produzem tanto LH ou FSH (gonadotróficos mono hormonal) e gonadotróficos bi-hormonais que alojam ambas as gonadotrofinas. Considerando que, no *pars distalis* todos os três tipos de gonadotróficos foram identificados, poucas ou nenhuma célula hormonal de FSH existe no *pars tuberalis* da pituitária da espécie equina. Esta heterogeneidade no padrão de armazenamento de LH e FSH, dentro da população de gonadotróficos é considerada a base morfológica para a regulação diferencial da secreção de LH e FSH em todo ciclo reprodutivo equino (TORTONESE et al., 2001).

O padrão divergente de liberação de LH e FSH é mais pronunciado na égua do que em muitas outras espécies de animais domésticos. Um aumento precoce pré-ovulatório nas concentrações periféricas de LH é acompanhado por um modesto aumento de FSH, posteriormente, recuando a sua menor concentração (BERGFELT et al., 1991) enquanto que a LH atinge o seu máximo. No meio da fase lútea, um segundo e robusto aumento do FSH ocorre

sem aumento concomitante de LH. Esta segunda onda de FSH ocorre em diferentes dias do ciclo, característica individual de cada égua (GINTHER et al., 2005).

No sangue da pituitária, a frequência de pulso gonadotrófico sobe de 0,5 pulsos por hora no início do pico de LH para 1,9 pulsos por hora no momento da ovulação. No sangue jugular, os pulsos de gonadotrofina são relativamente pequenos e, portanto, difíceis de detectar. Este é muito provavelmente o resultado da meia vida de ambas as gonadotrofinas no plasma equino (aproximadamente 5 horas). Durante o período pré-ovulatório, a frequência média detectável de pulsos periféricos de gonadotrofinas em circulação aumenta para cerca de 1 pulso por hora (ALEXANDER e IRVINE, 1987), enquanto que durante a fase lútea, a frequência dos impulsos de LH é tão baixa quanto 0,1 impulsos por hora (ALEXANDER e IRVINE, 1986).

Em comparação com outras espécies de animais domésticos, o ovário da égua tem uma estrutura única, caracterizada por um grande tamanho e peso, chegando a um volume de 35-120 cm³ e 40-80 g de peso (KIMURA et al., 2005), na presença de uma fossa ovulatória e sua estrutura é invertida onde o córtex é interno e a medula é externa. Uma a duas ondas foliculares distintas se desenvolvem durante um ciclo do estro. A primeira grande onda de crescimento folicular pode ocorrer no início da fase lútea. O folículo dominante desta onda precoce pode ser anovulatório, mas apesar do aumento das concentrações de progesterona pode ocorrer a ovulação.

O desenvolvimento de uma onda folicular ovulatória durante a fase lútea é um fenômeno considerado único para o equino. No entanto, ela não ocorre em todas as raças de cavalos na mesma medida: pôneis geralmente desenvolvem uma grande onda folicular, enquanto duas ondas foliculares são típicas de puros-sangues e raças de cavalos de esporte estão estreitamente relacionados (GINTHER, 2000).

A emergência de cada onda folicular é temporalmente associada com um pico de FSH, onde o mesmo atinge seu nível mais alto quando o maior folículo chega a um tamanho de cerca de 13mm de diâmetro (GASTAL et al., 1997). Subsequentemente, o FSH declina a uma concentração que não suporta manter o crescimento pronunciado de folículos subordinados, mas é suficiente para a continuação do crescimento do folículo dominante. Esta dissociação de tamanho dos membros de uma onda folicular e é conhecido como desvio folicular ou seleção. Emergência do futuro folículo dominante ocorre com um tamanho de 6 mm de diâmetro, aproximadamente 6 dias antes de diâmetro do folículo ocorre o desvio. No momento do desvio

o maio e o segundo maior folículo tem um tamanho médio de 22 e 19 milímetros, respectivamente (GINTHER, 2000).

Mudanças dramáticas no sistema do fator de crescimento, semelhante a insulina (IGF) (IGF-I e -II, Proteína de ligação a IGF, IGF proteases de proteínas de ligação), tem um papel crucial no folículo maior antes do início do desvio de tamanho (BEG e GINTHER, 2006). Simultaneamente, o folículo dominante suprime as concentrações circulantes de FSH, mais provavelmente devido a síntese e liberação folicular de estrogênos e inibina. Esta hipótese é suportada pela constatação de um aumento da produção de estradiol no futuro folículo dominante um dia antes da divergência folicular (GASTAL et al., 1999) em conjunto com uma relação inversa entre concentrações de FSH e inibina em circulação no cíclico égua (BERGFELT et al., 1991). É possível que o LH sistêmico está envolvido na divergência folicular, mas é necessário para outro crescimento do folículo dominante após o início do desvio (GINTHER, 2000).

A partir do desvio em diante, o folículo pré-ovulatório cresce numa taxa média de 3 milímetros por dia para um diâmetro de aproximadamente 35mm quatro dias antes da ovulação. Continuação crescimento ocorre até 2 dias antes da ovulação quando folicular tamanho atinge um patamar de aproximadamente 40 mm (GINTHER et al., 2008). Os folículos em equinos podem crescer na fase pré-ovulatória até um tamanho de 55 milímetros ou mais, com éguas ovulando consistentemente a partir dos diâmetros pré-ovulatórios semelhantes em ciclos consecutivos (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008).

Maduração histológica do folículo pré-ovulatório equino é caracterizada por uma grande expansão da sua camada de células da granulosa mural inteiro. Além disso, a acumulação da matriz extracelular é abundante. O processo ovulatório do folículo em equinos envolve uma única e específico padrão de regulação gênica nas células da teca e da granulosa. Isto inclui as diferenças na expressão de uma variedade de fatores entre eles prostaglandinas e enzimas metabolizadoras de prostaglandinas (SAVASITH et al., 2007).

Durante a ovulação, ovócito e corona radiata entrar no oviduto, enquanto a maior parte do fluido folicular passa para dentro da cavidade peritoneal. Hormônios deste fluido são rapidamente absorvidos pela circulação conduz a um aumento pronunciado em concentrações de inibina no dia da ovulação (BERGFELT et al., 1991).

Durante os 2,5 dias antes da ovulação, imediatamente a taxa de crescimento do folículo dominante em éguas de dupla ovulação é menos pronunciada do que em éguas solteiras resultantes ovulando em um diâmetro menor no folículo pré-ovulatório. O crescimento folicular reduzido está relacionado com menores concentrações de FSH, provavelmente devido à maiores concentrações de estradiol em dois folículos pré-ovulatórios (GINTHER et al., 2008).

O desenvolvimento folicular nas espécies monovulares é subscrito em três fases: primeiramente pela ativação do folículo primordial, em seguida ocorre o recrutamento folicular, posteriormente a seleção de um ou dois folículos dominantes em associação com a atresia dos folículos subordinados (GINTHER e BERGFELT, 1993).

Folículos são estruturas vesiculares, de forma arredondada, de apresentação desde irregular até esférica. A atividade folicular é influenciada de maneira significativa pelas condições do meio ambiente, podendo torná-la lenta ou bastante ativa, principalmente quando a fêmea se encontra no período que precede a estação de monta. De acordo com estudos realizados, a ovulação ocorre com folículo em torno de 35mm a 40mm e no máximo 60mm, algumas vezes folículos menores podem ovular, sendo estes de ovários pequenos, como de potras (ALLEN, 1994).

A égua possui folículos primordiais alojados no ovário estacionados em uma fase do seu desenvolvimento (prófase I da meiose I). O ovário é revestido em quase toda sua totalidade pelo mesovário, exceto na borda anterior média chamada fossa da ovulação. Esta é a única região onde ocorre a ovulação na espécie equina (WHITERSPOON, 1975).

O crescimento folicular envolve a proliferação e a diferenciação induzidas hormonalmente, tanto das células da teca como da granulosa. Tais processos levam a uma habilidade crescente dos folículos para produzir estradiol e responder a gonadotrofinas. A produção de estradiol determina qual folículo obterá um número de receptores para LH necessário para a ovulação e a luteinização. Distúrbios na habilidade das células da teca e da granulosa em responder aos sinais gonadotróficos levam à cessação do crescimento e ao início da atresia do folículo (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Segundo Hafez (2004) um dos motivos dessa variação no ciclo estral da égua, citado anteriormente, são a baixa sensibilidade dos ovários equinos ao FSH, que por isso levam um maior tempo para atingir o tamanho necessário para a ovulação. Outro pode ser a baixa concentração de LH comparada ao FSH, que pode causar atraso no pico de LH por sua vez na

ovulação, e também tem a migração quando o folículo recrutado está localizado mais distante no ovário e tem de migrar para a fossa ovulatória.

O FSH permanece sendo encontrado na circulação sistêmica (reduzido cerca de 50%), sendo que os folículos atingem somente cerca de 20 a 25 mm, principalmente pela falta de hormônio luteinizante (LH) (ALEXANDER; IRVINE, 1986). Esta diferença nos dois hormônios acontece, pois existe uma produção e liberação constitutiva de FSH (liberado das vesículas secretórias assim que é sintetizado), independente de GnRH do hipotálamo (MORRESEY, 2011).

O LH necessita de níveis normais de GnRH para uma síntese e liberação normal (GARZA et al., 1986). Existe inclusive uma alteração celular na hipófise, sendo a densidade de gonadotrofos na pars tuberalis 4 a 5 vezes menor durante o anestro, enquanto que a pars distalis não sofre alteração. Essa sazonalidade celular na pars tuberalis é considerada responsável pela liberação diferencial entre LH e FSH durante o ciclo reprodutivo da égua (TORTONESE et al., 2001).

Os níveis de LH irão diminuir provavelmente como consequência do feedback negativo da progesterona na responsividade da hipófise ao GnRH (GREAVES et al., 2001), maior regulador de secreção de LH em éguas (ALEXANDER e IRVINE, 1996). A progesterona circulante será responsável por cessar o comportamento de estro e iniciará o comportamento de diestro, deixando a égua de ser receptiva ao garanhão (BERGFELT, 2009).

O desenvolvimento folicular se inicia sem o estímulo de gonadotrofinas, porém completa o crescimento sob o auxílio das mesmas. No folículo pré-antral, as células da teca desenvolvem receptores para LH, resultando na síntese de andrógenos, por sua vez, FSH estimula a camada granulosa a converter andrógeno em estrógeno (CUNNINGHAM, 1999).

As ondas maiores podem ser subdivididas em secundárias (emergem durante o estro ou início do diestro e originam um folículo dominante anovulatório ou uma ovulação no diestro), e ondas primárias (emergem durante o diestro e dão origem a ovulação no estro). Nas ondas foliculares maiores os folículos exibem inicialmente um crescimento sincronizado seguido pelo crescimento diferenciado de um ou dois folículos que alcançará o diâmetro máximo antes de sua regressão ou ovulação (GINTHER, 1993).

A onda folicular primária de um ciclo estral é caracterizada por um folículo dominante e vários outros folículos subordinados. Um grupo de 7 a 11 folículos com tamanhos em

crescimento em torno de 5mm, podem ser detectados por ultrassom em cerca da metade de um ciclo de estral. Para distinguir entre os folículos que estão em crescimento ou regredindo é necessária mais de uma análise com o ultrassom, para não haver confusão com os folículos que estão entrando em atresia de uma outra onda pois podem ser confundidos com os folículos emergentes da nova onda (BERGEFELT e ADAMS, 2007).

Dotado de receptores nas células da granulosa para o hormônio folículo estimulante (FSH), os folículos antrais da onda ovulatória se desenvolvem em resposta a um aumento na circulação de FSH, ao mesmo tempo em que, as concentrações circulantes de progesterona estão diminuindo, enquanto as de inibina e hormônio luteinizante (LH) estão aumentando. As mudanças nas concentrações de FSH e LH durante o fim do diestro e o início do estro são atribuíveis, em parte, ao aumento das concentrações de inibina proveniente dos folículos dominante (BERGEFELT e ADAMS, 2007).

À medida que ocorre o desenvolvimento da onda folicular os folículos continuam o crescimento em uma taxa paralela (2 a 3 mm/dia) até que o futuro folículo dominante atinja de 20 a 25 mm (BERGEFELT e ADAMS, 2007).

A partir daí o crescimento, do folículo dominante se estabelece e os folículos remanescentes subordinados cessam o crescimento e, eventualmente, regredem. O mecanismo de seleção do folículo não é conhecido, mas parece envolver a disponibilização de receptores de LH permitindo ao folículo dominante uma maior capacidade para a produção de estradiol, sensibilidade à FSH, e especificidade para responder ao LH, através da indução de receptores das células da teca para LH (BERGEFELT e ADAMS, 2007).

A ovulação é resultado de alterações citológicas e bioquímicas na parede do folículo, para que a ovulação seja bem-sucedida o fluido folicular contendo o oócito tem que passar através do epitélio folicular, da lâmina basal, teca interna, teca externa, estroma ovariano, túnica albugínea e epitélio germinativo. Tipicamente próximo ao momento que o folículo é estimulado pelo LH, este cresce o suficiente para fazer uma protuberância na superfície do ovário, tanto que o estroma oferece pouca ou nenhuma resistência à ovulação (MC KINNON e VOSS, 1993)

Por este remodelamento tecidual e pela dissolução do coágulo no corpo hemorrágico. Pode ser notada uma separação das células do cumulus e posterior aproximação ao redor do oócito devido ao estímulo de síntese de collagenase pelo aumento da progesterona, o que provoca a formação da corona radiata (HAFEZ e HAFEZ, 2000). Três etapas importantes

devem ocorrer no folículo pré-ovulatório durante a ovulação. A primeira consiste na maturação do citoplasma e núcleo do oócito, em seguida uma diminuição da adesividade das células da granulosa e por fim adelgaçamento e ruptura da parede folicular externa (HAFEZ e HAFEZ, 2000).

O resultado é a evacuação do fluido folicular (GINTHER et al., 2004), células da granulosa e complexo cúmulos oócito (BERGFELT, 2009), levando a uma diminuição no tamanho do antro e acúmulo de fluido folicular na bursa ovariana e área circundante (BERGFELDT e ADAMS, 2007). Existem relatos na literatura dois tipos de evacuação folicular, a forma abrupta e a gradual (GINTHER, 2012), sendo a ocorrência de cada uma delas de 50%. Durante a abrupta, 15% do fluido folicular permanece no folículo, e sua duração é entre 5 a 90 segundos.

A liberação do fluido folicular lenta é gradual e dura entre 6 e 7 minutos, e 4 a 17% do volume inicial do folículo permanece. O desaparecimento completo do fluido antral e espaço extraovariano é bem mais lento podendo demorar entre 30 minutos até 5 a 20 horas (GINTHER, 2012). Com o advento da ovulação, os níveis de progesterona circulantes começam a aumentar gradualmente acompanhando o desenvolvimento do corpo lúteo.

O corpo lúteo é a estrutura responsável pela síntese e secreção da progesterona, fundamental para estabelecimento e manutenção da gestação em éguas (BOWEN - SHAUVER; GIBORI, 2004).

3.3 Formação e Composição do CL

A formação do CL após a ovulação é resultado de um dinâmico e complexo processo de luteinização das células do folículo, regulado por luteotrofinas (SKARZYNSKI; FERREIRA-DIAS; OKUDA, 2008), essencial para que possa ser sintetizada a progesterona (MURPHY, 2004). Esta glândula transitória (FERREIRA-DIAS et al., 2011), de natureza efêmera, torna-se única no ovário de mamíferos (MIYAMOTO et al., 2009), e é essencial para que a gestação possa se estabelecer (BOWEN-SHAUVER e GIBORI, 2004).

A fossa ovulatória é o resultado de um rearranjo estrutural único do ovário equino que é estabelecido antes da puberdade (GINTHER, 1992). Diferente do que ocorre em outras espécies domésticas o CL é totalmente contido no estroma ovariano, o que torna a avaliação por palpação muito difícil e subjetiva. O exame ultrassonográfico por sua vez é uma forma imediata e objetiva (GINTHER, 1995), sendo a abordagem mais atual para pesquisadores, clínicos

responsáveis pelo manejo reprodutivo, pois permite uma avaliação precisa, eficiente e segura do ovário e da glândula luteal, além do controle do desenvolvimento e detecção de um potencial mau funcionamento (BERGFELT e ADAMS, 2007).

Logo após a ovulação, ocorre uma desestruturação e reorganização da parede folicular, ruptura da membrana basal ocorrendo uma invasão de fibroblastos e vasos sanguíneos da teca interna para o corpo lúteo em desenvolvimento ao mesmo tempo que ocorre a hipertrofia das células da granulosa (GASTAL, 2011).

A luteinização envolve a morfogênese estrutural e funcional das células da granulosa produtoras de estrógeno para células luteais produtoras de progesterona (BERGFELT, 2009). O grau de migração e mistura das células derivadas do folículo na formação do CL difere entre as espécies. O tecido folicular sofre um extensivo rearranjo, envolvendo a diferenciação e crescimento das células luteais grandes e pequenas (ROBERTO DA COSTA et al., 2005) e proliferação de células não luteais (células do sistema imune e fibroblastos), além de grande angiogênese (FERREIRA-DIAS et al., 2006), sendo que todos os tipos celulares se encontram em grande proximidade (FARIN et al., 1986).

Apesar da ideia de que o CL seja formado apenas de células luteais, ele possui uma mistura heterogênea de tipos celulares, com aspecto anatômico e funções biológicas distintas (SKARZYNSKI; FERREIRA-DIAS; OKUDA, 2008). As outras células que formam o CL são fibroblastos, pericitos, células musculares lisas, células do sistema imune (macrófagos, linfócitos) e células endoteliais do folículo pós ovulatório (NISWENDER et al., 2000).

De acordo com Ginther (1992), as células da teca não serão precursoras das células luteais pequenas, uma vez que anterior à ocorrência da ovulação, elas iniciam um processo de degeneração e substituição por fibroblastos hipertrofiados, diferente do encontrado em outras espécies (VAN NIEKERK et al., 1975). Entretanto Watson (2000) encontraram células da teca entre as células luteais grandes no CL do meio do diestro, gerando ainda um debate com relação ao papel das células da teca na formação do corpo lúteo.

Ao longo do tempo de desenvolvimento do corpo lúteo, as quantidades de células produtoras de progesterona vão sofrendo alterações. Uma variação na proporção entre células luteais grandes e pequenas foi encontrada ao longo do ciclo estral, sendo que ela diminuiu de 46% no d4 a d5, para 38,5% no d8 a d9 para 24,3% no d12 a d 13 (WATSON; SERTICH, 1990). De acordo com Roberto da Costa et al. (2005), não houve diferença no número de células

luteais pequenas ao longo do desenvolvimento do CL contrastando com o aumento do número de células luteais grandes entre o corpo hemorrágico (CH) e o CL no meio do diestro. Em seguida, os números novamente diminuem, comparáveis com o CH.

No início da fase luteal, as células luteais produtoras de progesterona estão em intensa mitose (AGUILAR et al., 2006). A maioria das células que estão em proliferação durante o processo de formação do novo CL são células endoteliais que se encontram em condições de hipóxia. Por isso uma intensa angiogênese regulada por fatores angiogênicos, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) produzido pelas próprias células luteais se inicia (AL-ZI'ABI et al., 2003).

O corpo lúteo primário resulta da ovulação de um folículo dominante de uma onda folicular primária no ou perto do fim do estro, quando o estrógeno predomina circulante (GINTHER, 1992).

O corpo lúteo secundário resulta da ovulação de um folículo dominante que entrou em atresia durante o diestro ou início da gestação sob domínio progesterônico. Tanto o corpo lúteo primário quanto o secundário que se desenvolvem com uma cavidade com fluido são denominados corpo hemorrágico (GINTHER, 1990).

A maturação do CL primário é considerada completa entre os dias 5 e 10 pós ovulação (meio do diestro). O corpo lúteo da égua é funcional por cerca de 14 a 15 dias durante o ciclo não fertilizado (DAEL e HUGHES, 1993), até sofrer luteólise.

A morfologia do CL primário após a ovulação não é única e uniforme, sendo dois tipos descritos após a ovulação. A formação de corpo hemorrágico, que é um corpo lúteo com uma cavidade preenchida de sangue, ocorre em 50 a 70% dos ciclos de forma aleatória (BERGFELT, 2009). Geralmente a cavidade é detectada no d0 em 28% dos animais e no d1 em 62%. A parte da cavidade é maior proporcionalmente no início do diestro, e diminui gradativamente com a organização do coágulo e presença de tecido conjuntivo no meio do diestro. Eventualmente continua presente até o final do diestro (BERGFELT e ADAMS, 2011). Eles são em torno de 17% maiores do que o outro tipo, entretanto a área de tecido luteal é semelhante (BERGFELT e ADAMS, 2007). Ele pode se tornar uma estrutura sólida com o passar do tempo, assemelhando-se a CL sem cavidade (BERGFELT e ADAMS, 2011).

O CL que não apresenta cavidade acontece em 30-50% dos ciclos e permanece com este aspecto ao longo de sua duração (BERGFELT, 2009). A morfologia do CL não parece estar

associada a indivíduos e duplas ovulações parecem ter a mesma chance de serem iguais morfológicamente ou diferentes (GINTHER, 1992). Independente do aspecto morfológico da glândula lútea formada, a produção de progesterona e intervalo interovulatório são comparáveis (ARRUDA et al., 2001).

O corpo lúteo em éguas gestantes e não gestantes tem um comportamento funcional e morfológico semelhante até o dia 14 pós ovulação, quando se inicia o processo de lise do corpo lúteo nas não gestantes (SAMPER et al., 2007).

Quando ocorre a luteinização de um folículo dominante anovulatório, em especial no início da gestação, ele é denominado corpo lúteo acessório. Os corpos lúteos secundários e acessórios que se desenvolvem durante o diestro e início da gestação são denominados de corpos lúteos suplementares (GINTHER, 1990).

Por definição, os hormônios luteotróficos são aqueles que suportam o crescimento e função do CL (NISWENDER et al., 2000) e o LH e PGE₂ são considerados os principais representantes (FERREIRA-DIAS e SKARZYNSKI, 2008). O LH liberado de forma pulsátil pela hipófise é um dos reguladores de síntese e secreção de progesterona pelo CL mais potentes em animais domésticos (NISWENDER et al., 2002). Entretanto, apesar de ter sido considerado por décadas o único hormônio responsável pela ovulação e formação, desenvolvimento, manutenção e função secretória do CL (GINTHER, 1992), sabe-se que o mecanismo de controle do CL é bem mais complexo, e pode envolver fatores produzidos tanto dentro do CL como fora do ovário.

A progesterona tem efeito luteotrófico (ROTCCHILD, 1981) e influencia a síntese de esteroide pelo CL (KOTWICA; REKAWIECKI; DURAS et al., 2004) em muitas espécies. A ação da progesterona de forma autócrina por meio do receptor de progesterona parece manter a função endócrina do CL, pois suprime o início da apoptose (SKARZYNSKI e OKUDA, 1999). A expressão de seus receptores no CL equino aumenta concomitantemente com o aumento da progesterona circulante em células luteais grandes, enquanto não encontraram expressão em células luteais pequenas (FERREIRA-DIAS e SKARZYNSKI, 2008).

Ao longo de todo o ciclo, percebe-se a região que separa o tecido lúteo (menos ecogênico) do estroma ovariano (mais ecogênico, tecido mais denso e menos vascularizado) devido à diferença de impedância dos ecos na interface dos tecidos. Deste modo, o CL é facilmente identificado no ovário ao longo de todo o ciclo, até regredir (BERGFELT e ADAMS, 2011).

Desta forma, informações morfológicas (área, diâmetro e ecogenicidade luteal) e funcionais (fluxo sanguíneo) tornam-se extremamente úteis, pois têm alta correlação com características endócrinas (produção de progesterona) ao longo da maturação e regressão durante o ciclo estral e início da gestação (SAMPER et al., 2007).

Conforme a maturação do CL ocorre, as células luteais aumentam de diâmetro, apresentam núcleo vesiculado e vacúolos pequenos no citoplasma, indicando um aumento de síntese celular e secreção de progesterona. Concomitantemente com estas alterações morfológicas e funcionais típicas da luteinização, a gênese de vasos sanguíneos e linfáticos acompanha a invasão do tecido luteal pelo estroma. Nesta fase, o tecido é mais esparsa, as células são maiores e secretoras e o fluxo sanguíneo e linfático para o corpo lúteo é maior. Desta forma justifica-se a menor ecogenicidade apresentada pelo CL maduro durante o meio do diestro. A regressão luteal é caracterizada por uma ecogenicidade aumentada novamente durante o final do diestro (GINTHER, 1992).

Outra avaliação morfológica avaliada é a medida do diâmetro do corpo lúteo, realizada na maior imagem ao ultrassom encontrada e congelada. A maior medida de um lado a outro é feita e em seguida uma medida perpendicular a esta. Calcula-se a média das duas e determinam-se o diâmetro médio (BERGFELT e ADAMS, 2011).

Durante os dias 0 e 5 pós ovulação (diestro inicial) ocorre uma maturação funcional do CL, evidenciada por um aumento progressivo das concentrações de progesterona circulantes associada com um aumento do diâmetro e área do CL. Ginther et al. (2007) detectaram um decréscimo gradual na área do CL do d4 ao d19. Entretanto o volume das células produtoras de progesterona aumenta significativamente do início da fase luteal ao meio, quando o volume máximo é atingido (AGUILAR et al., 2006).

Após o dia 9, é iniciada a regressão funcional do CL, que se caracteriza por diminuição progressiva dos níveis de progesterona, do diâmetro, área e vascularização do CL e um aumento de sua ecogenicidade. As mudanças morfológicas do CL antecedem mudanças funcionais tanto na maturação como na regressão (BERGFELT e ADAMS, 2007).

O corpo lúteo é um dos tecidos mais vascularizados do corpo e durante seu rápido crescimento fisiológico, um intenso processo de angiogênese se inicia (MULLER; ELLENBERGER; SCHOON, 2009) que é essencial para sua formação e desenvolvimento, resultando em uma rede capilar extensa (REDMER e REYNOLDS, 1996) e uma pronta

produção de progesterona pela estrutura recém-formada (ROBERTO DA COSTA et al., 2005). Sua regressão, por sua vez, envolve alterações e morte celular por apoptose das mesmas células vasculares que permitiram seu grande crescimento (FERREIRA-DIAS et al., 2006).

A quantidade de capilares é tão grande que cada célula lútea pelo menos está em contato com um dos capilares recém-formados (ZHENG; REDMER; REYNOLDS, 1996). Exemplificando esta proximidade, 59% das células luteais estavam diretamente adjacentes a um capilar e 37% adjacente ao tecido intersticial próximo a um capilar. Essa proximidade otimiza a função da glândula endócrina temporária de síntese de progesterona, pois fornece precursores necessários e uma eficiente distribuição da progesterona produzida para a circulação (AL ZI'ABI et al., 2003).

Um aumento na área de microvascularização do CL nas fases iniciais e no meio do diestro ocorre apesar do número de vasos ser maior no meio e final do diestro. O aumento do número de vasos e diminuição das áreas vasculares pode ser explicado por uma diminuição no lúmen do vaso sanguíneo e contração do vaso, tendo aspecto de anéis concêntricos (FERREIRA-DIAS et al., 2006). Essa redução no diâmetro vascular pode levar a uma diminuição do fluxo sanguíneo, e iniciar ou acelerar o processo de regressão do CL (GÁYTAIN et al., 1999). No corpo albicans ocorre a oclusão dos vasos que desaparecem junto com a estrutura em regressão, reduzindo seu número e densidade (FERREIRA-DIAS et al., 2006).

Uma série de fatores anti-angiogênicos provavelmente exercem função na regressão do CL e modulação da angiogênese como a angiostatina, endostatina, trombospondina e fator plaquetário quatro. Alguns destes fatores anti-angiogênicos podem participar também da formação do corpo lúteo para garantir que não ocorra uma vascularização excessiva e mediar apoptose durante a regressão luteal. As células do endotélio microvascular são as primeiras a sofrer apoptose, que aumenta na fase luteal tardia e a mitogênese endotelial diminui (FERREIRA-DIAS et al., 2006).

Por ser uma das partes mais vascularizadas do corpo na égua, a avaliação do fluxo sanguíneo do CL pode ser usada como indicador de integridade fisiológica no ovário (BERGFELT e ADAMS, 2011). O fluxo sanguíneo para o recém-formado corpo lúteo foi avaliado utilizando ultrassonografia modo B e Color Doppler (GINTHER et al., 2007). Neste estudo, três regiões diferentes foram escaneadas a cada 12 horas até o dia 6 do ciclo, sendo elas o terço basal, médio e apical. O início da vascularização do corpo lúteo após a ovulação ocorreu na base, onde alguns vasos do folículo permaneceram. Notou-se então um padrão de

vascularização crescente da base em direção ao ápice ao longo dos 6 próximos dias (6 dias pós ovulação) (GASTAL, 2011).

Estudos detectaram (GINTHER et al., 2007a) um aumento progressivo nas concentrações plasmáticas de progesterona e porcentagem de fluxo sanguíneo no corpo lúteo até níveis máximos durante a primeira semana após a ovulação. Este padrão ocorreu nas éguas com ovulações denominadas de evacuação normal. Nas éguas com ovulações do tipo septadas foi notada outro tipo de vascularização, sendo que todas as partes do corpo lúteo eram vascularizadas desde o início, sugerindo que vasos de toda a periferia contribuam para a vascularização do novo corpo lúteo (GASTAL, 2011).

Um aumento no fluxo sanguíneo acontece entre os dias 0 e 5 pós ovulação (BERGFELT e ADAMS, 2011). De acordo com Bollwein et al. (2002), o número médio de pixels por imagem de CL atinge valor máximo no dia 5, diminuiu entre 7 e 15 pós ovulação, sendo associado com a regressão luteal. Entre os dias 5 e 7 pós ovulação, atingem-se as maiores concentrações circulantes de progesterona, máxima vascularização e mínima ecogenicidade. Do 5º dia em diante, a vascularização do CL começa gradualmente a diminuir (GINTHER et al., 2007b).

A partir do 10º dia pós ovulação, uma queda na progesterona indica regressão funcional do CL, em conjunto com uma diminuição do diâmetro e área, e redução no fluxo sanguíneo (ADAMS, 2011).

As concentrações séricas de progesterona são dependentes da quantidade de tecido esteroidogênico, fluxo sanguíneo e capacidade do tecido esteroidogênico de produzir progesterona. A quantidade de tecido esteroidogênico é dependente do número e tamanho das células luteais, que aumentam no decorrer do desenvolvimento luteal (NISWENDER et al., 2000).

No momento da ovulação tanto o estradiol como a inibina diminuem no início do diestro (BERGFELT, 2009), aumentando imediatamente a progesterona na hora da ovulação, iniciando cedo na fase luteal e acompanhada por um aumento dos receptores de progesterona e proliferação de células luteais grandes até o meio da fase luteal (ROBERTO DA COSTA et al., 2005).

Após a ovulação ocorrem aumentos periódicos de baixa magnitude de LH que serão luteotróficos e garantirão o desenvolvimento e manutenção do CL, e resultam no aumento das concentrações de progesterona. Paradoxalmente, este aumento da progesterona fará com que

aconteça um feedback negativo no LH e consequente diminuição dos seus níveis até atingirem o nível basal novamente ao redor do dia 6 pós ovulação. As concentrações de progesterona vão aumentando até o dia 8 pós ovulação (AURICH, 2011).

Sem o suporte luteotrófico do LH as concentrações de progesterona diminuem levemente e se mantêm moderada durante o meio e final do diestro (BERGFELT, 2009), quando decrescem até o momento da luteólise aproximadamente no dia 14 (AURICH, 2011).

3.4 Avaliação do CL com ultrassom Doppler colorido

Em 1842, o pesquisador austríaco Johann Christian Doppler descreveu o efeito doppler como a alteração na frequência de uma onda emitida ou refletida por um objeto que se encontra em movimento em relação ao observador (CERRI et al., 1998a). Seguindo este princípio, a US Doppler baseia-se na movimentação das hemácias em relação ao transdutor, de forma que alterações de velocidade e sentido do fluxo sanguíneo são representados por imagens com específicas cores e tonalidades (GINTHER, 2007).

Entre as biotécnicas, a US Doppler demonstrou ser uma alternativa efetiva e prática para avaliação não invasiva e em tempo real da perfusão sanguínea do trato reprodutivo de animais de grande porte. Seguindo este princípio, a US Doppler baseia-se na movimentação das hemácias em relação ao transdutor, de forma que alterações de velocidade e sentido do fluxo sanguíneo são representados por imagens com específicas cores e tonalidades (GINTHER, 2007).

Com a ferramenta da ultrassonografia (US) colorida Doppler na reprodução equina, foi possível reavaliar conceitos antes considerados definitivos quanto à fisiologia da reprodução. Essa técnica demonstrou ser efetiva e prática para a avaliação não invasiva e em tempo real da perfusão vascular do trato reprodutivo de equinos (GINTHER, 2007).

Em éguas, o exame Doppler é a única técnica atualmente disponível para o estudo in vivo das alterações imediatas da perfusão vascular uterina e ovariana. Essas informações podem ser utilizadas para a avaliação de diferentes fenômenos fisiológicos e patológicos do sistema reprodutivo, como, por exemplo o potencial ovulatório de folículos, a função secretora do corpo lúteo (CL), o reconhecimento maternal da gestação, a viabilidade embrionária e a sexagem fetal.

A ecogenicidade do CL pode ser classificada por um escore de tons de cinza no Modo B do ultrassom. Escores baixos indicam escuro, ou seja, hipoeecogênico e escores altos representam tecido claro, mais ecogênico. A avaliação visual do CL é baseada em um escore de cinza de 0 (preto, anecóico) a 4 (branco, hiperecóico) (BERGFELT e ADAMS, 2011). Utilizando análises subjetivas e objetivas por mensuração de pixels da imagem, Ginther (1995) mostrou paralelismo entre os resultados, demonstrando a confiabilidade da avaliação subjetiva. Como a avaliação subjetiva é mais prática, ela pode ser utilizada como ferramenta diagnóstica no desenvolvimento do corpo lúteo (GINTHER, 1995).

Um corpo lúteo ainda no início do diestro apresenta alta ecogenicidade, devido à aposição das paredes foliculares, e o tecido durante o processo de luteinização é mais denso. Os escores de ecogenicidade aumentam após a ovulação, atingindo valores máximos entre 24 e 48h. A partir deste momento, os valores diminuem progressivamente, até chegarem a valores baixos no dia 9 pós ovulação (BERGFELT e ADAMS, 2007).

O aparelho de ultrassonografia Doppler apresenta três modos de ação distintos: modo-B, modo Doppler e modo-Espectral. O modo-B utiliza escalas de cinza e é primordialmente empregado para a identificação anatômica de estruturas. Através do modo-Doppler, subdividido em funções color e powerflow, é possível estimar a perfusão sanguínea tecidual, levando-se em consideração a percentagem de tecido com pixels coloridos durante o exame. A adequada mensuração das velocidades de fluxo sanguíneo durante o exame espectral é dependente da correta angulação entre o transdutor e o vaso sanguíneo avaliado (GINTHER, 2007).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, J.; HANKS, M.; SHAW, D. J.; ELSE, R.; WATSON, E. Importance of using guarded techniques for the preparation of endometrial cytology smears in mares. *Theriogenology*, v. 66, p. 423---430, 2006.
- ALEXANDER, S. L.; IRVINE, C. H. G. Effect of graded doses of gonadotrophin-releasing hormone on serum LH concentrations in mares in various reproductive states: comparison with endogenously generated LH pulses. *Journal of Endocrinology*, v. 110, p. 19–26, 1986.
- ALEXANDER, S. L.; IRVINE, C. H. G. GnRH secretion in the mare. *Anim. Reprod. Science*, v. 42, p. 173-180, 1996.

ALEXANDER, S. L.; IRVINE, C. H. G. GnRH secretion in the mare. *Animal Reproduction Science*, v. 42, n. 1-4, p. 173-180, 1996.

ALLEN, W. E. *Fertilidade e obstetrícia Equina*. São Paulo: Varela, 207p, 1994.

AL-ZI' ABI, M.O.; WATSON, E.D.; FRASER, H.M. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. *Reproduction*, 125, 259-270, 2003.

ARRUDA, R. P. Manejo reprodutivo de fêmeas equinas. In: SEMANA DE ZOOTECNIA, 13^a, 1990. São Paulo. Anais... São Paulo: USP, p. 39-48, 1990.

ARRUDA, R.A.; VISINTIN, J.A.; FLEURY, J.J.; GARCIA, A.R.; MADUREIRA, E.H.; CELEGHINI, E.C.C.; NEVESNETO, J.R. Existem relações entre tamanho e morfo ecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultrassom e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões equinos? *Brazilian Journal of Veterinary Animal Science*, v.38,n.5,p.233-239, 2001.

AURICH, C. Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*, v. 124, n. 3---4, p. 220-228, 2011.

BEG, M. A.; BERGFELT, D. R. Corpus luteum development. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. *Equine reproduction*. 2. ed. [S.l.]: Wiley Blackwell, 2011. p. 2009---2019.

BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction*, v. 132, p. 365–377, 2006.

BERGFELT, D. R. Anatomy and physiology of the mare In: SAMPER, J. C. *Equine breeding management and artificial insemination*. 2. ed. St. Luis: Saunders, 2009. p. 113---131.

BERGFELT, D. R.; ADAMS, G. P. 2007. The normal female reproductive system: Ovulation and corpus luteum development. DI Dalam: SAMPER, J. C. *et al.* editor. 2007. *Current therapy in equine reproduction*. Missouri: Saunders Elsevier. 2007.

BERGFELT, D. R.; MANN, B. G.; SCHWARTZ, N. B.; GINTHER O. J. Circulating concentrations of immunoreactive inhibin and FSH during the estrous cycle of mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 11, p. 319---22, 1991.

BERGFELT, D.R.; ADAMS, G.P. Luteal Development.In: MCKINNON, A.O.; SQUIRES.E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. *Equine reproduction*. 2.ed. [S.l.]:Wiley Blackwell. p.2055G2064, 2011.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J. *et al.* *Manual of Equine Reproduction*. 2 ed. St. Louis: Mosby, 2003.

BOLLWEIN, H.R.; MAYER, F.W.; STOLLA R.: Luteal blood flow during the estrus cycle in mares. *Theriogenology* 57, 2043-2051, 2002.

BOWEN-SHAUVER, J. M.; GIBORI, G. The corpus luteum of pregnancy. In: ADASHI, E. Y.; LEUNG, P. C. K. The ovary. New York: Raven Press. 2004. p. 201-232.

CAIADO, J.R.C.; FONSECA, F.A.; SILVA, J.F.S. et al. Aplicação do flunixin meglumine antes da transferência não-cirúrgica de embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v.12, n.1-3, p.11-15, 2005.

CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ, R.J.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M.A.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.. 2000. Factors affecting pregnancy rates and earlyembryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology* 54,965–979.

CERRI, G.G. et al. Princípios básicos e instrumentação. In: Cerri, G.G. (Ed) *Doppler*. São Paulo: Sarvier, 1998a. Cap.1, p.1-14.

CUERVO-ARANGO, J.; NEWCOMBE, J. R. Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. *Theriogenology*, v. 69, p. 681–687, 2008.

CUNNINGHAM, J. G. Tratado de Fisiologia Veterinária. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 528p, 1999.

DAELS, P. F. Management of spring transition. In: 8TH AAEP ANNUAL RESORT SYMPOSIUM, Italy. Anais... Italy: 2006.

DAELS, P. F.; HUGHES, J. P. The Normal Estrous Cycle. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 121-132.

DAVISON, A.; MCMANUS, C. J.; FITZGERALD, B. P. Gonadotropin response to naloxone in the mare: effect of the time of year and reproductive status. *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 1195-1199, 1998.

DUKES, H. H. Fisiologia dos animais domésticos. 11ª Ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan S. A., 856p, 1993.

FARIN, C. E.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R.; GAMBONI, F.; NISWENDER, G. D. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, v. 35, p. 1299--1308, 1986.

FERREIRA-DIAS, G.; BRAVO, P. P.; MATEUS, L. Microvascularization and angiogenic activity of equine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 30, p. 247-259, 2006.

FERREIRA-DIAS, G.; COSTA, A. S.; MATEUS, L.; KORZEKWA, A. J.; GALVÃO, A. Nitric oxide stimulates progesterone and prostaglandin E₂ secretion as well as angiogenic activity in the equine corpus luteum. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 40, n. 1, p. 1-9, 2011.

- FINDLAY, J. K. Angiogenesis in reproductive tissues. *J. Endocrinol.*, v. 111, p. 357–366, 1986.
- FITZGERALD, B. P.; MCMANUS, C. J. Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 335-340, 2000.
- FITZGERALD, B. P.; SCHMIDT, M. J. Absence of an association between melatonin and reproductive activity in mares during the nonbreeding season. *Biology of Reproduction Monograph*, v. 1, p. 425-434, 1995.
- FLEURY, J.J. Transporte de embriões eqüinos e sua aplicação no Brasil. *Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v.26, n.1, p.264, 1998b.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. United Nations, 2011.
- GARZA, F. J.; THOMPSON, D. L.; FRENCH, D. D.; WIEST, J. J.; GEORGE, R. L.; ASHLEY, K. B.; JONES, L. S.; MITCHELL, P. S.; MCNEILL, D. R. Active immunization of intact mares against gonadotropin-releasing hormone: differential effects on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction*, v. 35, p. 347-352, 1986.
- GASTAL, E. L. Ovulation: Part 2. Ultrasonographic morphology of the preovulatory follicle. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. *Equine Reproduction*. 2. ed. [S.l.]: Wiley Blackwell, 2011. p. 2032-2054.
- GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 1320-1327, 1997.
- GINTHER OJ. Endocrinology of pregnancy (Roles of eCG). In: *Reproductive biology of the mare. Basic and applied aspects*. Second edition. Cross Plains, Wisconsin: Equiservices; 1992. p. 434–6.
- GINTHER OJ. Maternal aspects of pregnancy. In: *Reproductive biology of the mare. Basic and applied aspects*. Second edition. Cross Plains, Wisconsin: Equiservices; 1992. p. 324–8.
- GINTHER OJ. *Reproductive biology of the mare*. WI, USA: Equiservices Publishing; 1992.
- GINTHER, O. J. & BERGFELT, D. R. Growth of animal follicles and concentrations of FSH during the equine estrous cycles. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.99, p.105-111, 1993.
- GINTHER, O. J. Hemorrhagic follicles. In: *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*, 2nd Edition. Equiservices, p. 224–226. 1992.
- GINTHER, O. J. Major and minor follicular waves during the equine estrous cycle. *Journal Equine Veterinary Science*. v. 13, n. 1, p. 18-25, 1993.
- GINTHER, O. J. *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects*. 2. ed, Wisconsin: Equiservices, Cross Plains, 640 p, 1992.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*, v. 60–61, p. 61–79, 2000.

GINTHER, O. J. The mare: A 1000-pound guinea pig for study of the ovulatory follicular wave in women, *Theriogenology*, v. 77, p. 818-828, 2012.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A. Dynamics of circulating progesterone concentrations before and during luteolysis: a comparison between cattle and horses. *Biology of Reproduction*, v. 86, n. 6, p. 1-12, 2012.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. *Biology of Reproduction*, v.73, p.315-323, 2005.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O., UTT, M.D., BEG, M.A.. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Anim Reprod Sci*, v.99, p.213-220, 2007b.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Effect of prostaglandin F2alpha on ovarian, adrenal, and pituitary hormones and on luteal blood flow in mares. *Domest Anim Endocrinol*, v.32, p.315-328, 2007a.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; UTT, M.D.; BEG, M.A. 2007. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 99, 213–220.

GINTHER, O.J.; RODRIGUES, B.L., FERREIRA, J.C., ARAUJO, R.R., BEG, M.A.. Characterisation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF2alpha (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. *Reprod Fertil Dev*, v.20, p.684-693, 2008.

GONZALES, F. H. D. Introdução à endocrinologia reprodutiva veterinária. UFRGS, Porto Alegre, 2002.

GREAVES, H. E.; KALARIOTES, V.; CLEAVER, B.D.; POTER, M. B.; SHARP, D. C. Effects of ovarian input on GnRH and LH secretion immediately postovulation in pony mares. *Theriogenology*, v. 55, p.1095-1106, 2001.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7ed. São Paulo: Manole, 200p, 2004.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. *Reproduction in Farm Animals*. 7. ed. Philadelphia: Williams e Wilkins, 2000.

HART, P. J.; SQUIRES, E. L.; IMEL, K. L.; NETT, T. M. Seasonal variation in hypothalamic content of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), pituitary receptors for GnRH, and pituitary content of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the mare. *Biology of Reproduction*, v. 30, n. 5, p. 1055-1062, 1984.

HEIDLER, B.; AURICH, J. E.; POHL, W.; AURICH, C. Body weight of mares and foals, estrous cycles and plasma glucose concentration in lactating and non-lactating Lipizzaner mares. *Theriogenology*, v. 61, p. 883-893, 2004.

HENDRIKS, K.; COLLEONI, S.; GALLI, C.; PARIS, D.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B.; STOUT T. 2015. Maternal age and in vitro culture affect mitochondrial number and function in equine oocytes and embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 27, 957–968.

KING, S. S. Autumnal transition out of the breeding season. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. *Equine reproduction*. 2. ed. [S.l.]: Wiley Blackwell, 2011. p. 1732-1753.

KING, S. S.; NEUMANN, K. R.; NEQUIN, L. G.; WEEDMAN, B. J. Time of onset and ovarian state prior to entry into winter anestrus *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 13, p. 512–515, 1993.

KING, S.S.; NEQUIN, L. G.; DRAJE, S.; HEBNER, T. S. ROSER, J. F.; EVANS, J. W. Progesterone levels correlate with impending anestrus in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 8, p.109-11, 1988.

KLAGSBRUN, M.; D'AMORE, P. A. Regulators of angiogenesis. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 53, p. 217–239, 1991.

KNOTTENBELT, D. C; PASCOE, R. R. *Afecções e distúrbios do cavalo*. São Paulo: Manole, 432p, 1998.

KOTWICA, J.; REKAWIECKI, R.; DURAS, M. Stimulatory influence of progesterone on its own synthesis in bovine corpus luteum. *Bull Veterinary Institute Polawy*, v. 48, p. 139 - 145, 2004.

LEITE, D. M. Efeitos negativos do estresse sobre o desempenho reprodutivo. *Seminário de Endocrinologia da reprodução*, PPGCV / UFRGS, 16p, 2002.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. *Estudo do complexo do agronegócio cavalo*. Piracicaba: ESALQ/USP, 250 p, 2006.

LOFSTEDT, R. M. Diestrus. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. *Equine reproduction*. 2. ed. [S.l.]: Wiley Blackwell, 2011. p. 1728-1731.

MACHADO, M. S. Dinâmica folicular em éguas. In: *SEMINÁRIO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO*, 2002, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, 20p, 2002.

MCCUE, P. M.; SCOGGIN, C. F.; LINDHOLM, A. R. G. Estrus. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. *Equine reproduction*. 2. ed. [S.l.]: Wiley Blackwell, 2011. p. 1716-1727.

- MCKINNON, A. O. & VOSS, J. L. The estrous cycles. In: Mckinnon, Equine Reproduction. Malvern: Lea & Febizer, p. 114 – 189. 1993.
- MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; SASAHARA, K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. Domestic Animal Endocrinology, v. 37, p. 159-169, 2009.
- MORRESEY, P. R. How hormones work. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. Equine reproduction. 2. ed. [S.l.]: Wiley Blackwell, 2011. p. 1601-1607.
- MURPHY, B. D. Luteinization. In: ADASHI, E. Y.; LEUNG, P. C. K. The ovary. New York: Raven Press. 2004. p. 185-195.
- NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. Animal Reproduction Science, v. 60---61, p. 245---262, 2000.
- NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; INTUSH, E. W. M. C. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. Physiological Reviews, v. 80, n. 1, p. 1---30, 2000.
- OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Nonsurgical recovery of equine eggs, and an attempt at nonsurgical egg transfer in horses. Journal of Reproduction and Fertility, v.31, p.187-195, 1972.
- PALMER, E.; DRIANCOURT, M. A. Some interactions of season of foaling, photoperiod and ovarian activity in the equine. Livestock Production Science, v. 10, p. 197-210, 1983.
- PALMER, E.; GUILLAME, D. Photoperiodism in the equines species – what is a long night? Animal Reproduction Science. v.28, p.21-30, 1992.
- PLENDL, J. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. Anatomy Histology Embryology, v. 29, p. 257–266, 2000.
- REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the ovary. Rev. Reprod., v. 1, p. 182–192. 1996.
- ROBERTO DA COSTA, R. P.; BRANCO, V.; PESSA, P.; ROBALO SILVA. J.; FERREIRA-DIAS, G. Progesterone receptors and proliferating cell nuclear antigen expression in the equine luteal tissue. Journal of Reproduction Fertility Development, v. 17, p. 659-666, 2005.
- ROTCHILD, I. The regulation of the mammalian corpus luteum. Records Program Hormone Research, v. 37, p. 183-198, 1981.
- SAMPER, J.C. et al. Insemination with frozen semen. In: RUDOLPH, P.; GOWER, J. (Ed.). Current therapy in equine reproduction. Missouri: Saunders Elseviers, 2007. p.285-288.
- SANTOS, V. P. O estresse e a reprodução. Seminário de Endocrinologia da Reprodução, PPGCV / UFRGS, 15p, 2003.

SAYASITH, K.; BOUCHARD, N.; DORÉ, M.; SIROIS, J. Cloning of equine prostaglandin dehydrogenase and its gonadotropin--dependent regulation in theca and mural granulosa cells of equine preovulatory follicles during the ovulatory process. *Reproduction*, v. 133, p. 455–466, 2007.

SHARP, D. C. Vernal transition into the breeding season. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. *Equine reproduction*. 2. ed. [S.l.]: Wiley Blackwell, 2011. p. 1704-1715.

SKARZYNSKI, D. J.; FERREIRA-DIAS, G.; OKUDA, K. Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 57-65, 2008. Supplement, 2.

SKARZYNSKI, D. J.; OKUDA, K. Sensitivity of bovine corpora lútea to prostaglandin F2a is dependent on progesterone, oxytocin and prostaglandins. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 1292-1298, 1999.

STROUD, B.; CALLESEN, H. IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. *Animal Reproduction*, v. 9, n. 3, p. 210-216, 2012.

TAROUCO, A. K. *Fisiologia reprodutiva da égua*, 2006.

THOMPSON, D. L. Anestrus In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. *Equine reproduction*. 2. ed. [S.l.]: Wiley Blackwell, 2011. p. 1696-1703.

TORTONESE, D. J.; GREGORY, S. J.; EAGLE, R. C.; SNEDDON, C. L.; YOUNG, C. L.; TOWNSEND, J. The equine hypophysis: a gland for all seasons. *Reproduction Fertility and Development*, v. 13, p. 591–597, 2001.

VAN NIEKERK, C. H.; MORGENTHAL, J. C.; GERNEKE, W. H. Relationship between morphology of and progesterone production by the corpus luteum of the mare. *Journal Reproduction Fertility*, v. 23, p. 171–175, 1975. Suplemento.

WATSON, E. D. Compartmentalization of steroidogenesis by the equine corpus luteum. *Theriogenology*, v. 53, p. 1459-66, 2000.

WATSON, E. D.; SERTICH, P.L. Secretion of prostaglandins and progesterone by cells from corpora lutea of mares. *Journal of Reproduction Fertility*, v. 88, p. 223-229, 1990.

WEEDMAN, B. J.; KING, S. S.; NEUMANN, K. R.; NEQUIN, L. G. Comparison off circulating estradiol -17 and folliculogenesis during the breeding season, autumn transition and anestrus in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 13, p. 502-505, 1993.

WHITERSPOON, D. M. The site of ovulation in the mare. *Journal Reproduction Fertility*, Suppl. V.23, p.329-330, 1975.

WINTZER, H. J. Doenças dos equinos. São Paulo: Manole, 438p, 1990.

ZHENG, J.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Vascular development and heparin-binding growth factors in the bovine corpus luteum at several stages of the estrous cycle, *Biology of Reproduction*, v. 49, p. 1177–1189, 1993.

5. Artigo Científico

AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DOPPLER DO CORPO LÚTEO DE ÉGUAS RECEPTORAS

Doppler Ultrasound evaluation of luteus corpus of recipient mares

Sales, F.A.B.M.¹; Azevedo, M.V.²; Lima, P.F.³; Oliveira, M.A.L.³; Coutinho, C.B.³; Souza, N.M.⁴

¹ Autor, Mestrando em Ciência Animal, pela UFRPE Recife-PE, BR; ² Doutorando em Ciência Animal, pela UFRPE Recife-PE; ³ Prof. Dr. Do DMV UFRPE Recife-PE, ⁴ Doutoranda em Ciência Animal, pela UFRPE Recife-PE BR. End.: Rua Ascendino Neves nº 39, Torre, Recife-PE. CEP 50710-070

E-mail: felipeabms@outlook.com

RESUMO

Objetivou-se correlacionar a produção de P4 com as dimensões do folículo e o aporte sanguíneo do CL por ultrassonografia Doppler para determinar o melhor dia para inovulação de embriões através da taxa de P4, tônus uterino, perfusão vascular e dimensões do CL nos dias mais utilizados para inovulação de embrião em um programa comercial; e validar o método de avaliação subjetiva da perfusão vascular do CL por ultrassonografia Doppler. Foram utilizadas 30 éguas mestiças divididas aleatoriamente entre os 4 grupos de acordo com os dias pós ovulação: G1(3 dias), G2(4 dias), G3(5 dias) e G4(6 dias). Cada CL foi avaliado um único dia com o modo Color-Doppler. Foi realizada a aplicação do agente luteolítico, monitoramento ultrassonográfico modo-B até que o maior folículo atingisse 33 mm e o endométrio apresentasse edema 2 ou 3, momento da indução da ovulação e exames ultrassonográficos modo-B, até a ovulação. A PV luteal e do endométrio, foram avaliados de maneira subjetiva e objetiva. A mensuração de P4 foi determinada por um sistema automatizado de quimioluminescência. A concentração de P4 encontrada foi de, G1 $7,49 \pm 3,07$, G2 $6,49 \pm 1,37$, G3 $9,63 \pm 1,35$, G4 $20,67 \pm 3,37$ ($P < 0,05$), PV CL objetiva foi de G1 612 ± 131 , G2 905 ± 153 , G3 1059 ± 95 , G4 1084 ± 267 ($P > 0,05$), PV CL subjetiva foi de G1 $42,29 \pm 9,23$, G2 $43,44 \pm 3,71$, G3 $49,64 \pm 2,55$, G4 $57,52 \pm 2,17$ ($P > 0,05$). As correlações obteve-se: PV CL objetiva x PV CL subjetiva ($r = 0,72$), P4 x PV CL subjetiva ($r = 0,63$) P4 x diâmetro do CL ($r = 0,12$) . Diâmetro x PV CL objetivo ($r = -0,03$). Tônus uterino x P4, ($r = 0,22$), PV CL objetiva e tônus uterino x PV CL subjetiva ($r = 0,22$). Conclui-se que entre os dias analisados o 6º dia pós ovulação é o melhor dia para realizar a inovulação de embrião, por possuir o maior nível plasmático de P4, não havendo diferença entre as dimensões do CL, a PV do CL e o tônus uterino. As dimensões do CL não

demonstram sua funcionalidade e sim a vascularização por estar relacionada com a produção de P4, indicando que o Modo-Doppler é o método mais eficiente para avaliação da funcionalidade do CL. A análise subjetiva possui forte correlação com a objetiva, sendo de fácil e rápida realização.

Palavras-chave: Corpo Lúteo, Progesterona, Doppler, Vascularização.

ABSTRACT

It was aimed to correlate the P4 production with the CL blood supply and its dimensions with Doppler Ultrasound; determine the best day to transfer the embryo through the P4 level, uterine tone, vascular perfusion and CL dimensions at the most used timing to embryo transfer in a commercial program; and to validate the method of subjective evaluation of the VP of the CL by Doppler ultrasound. It was used 30 mixed breed mares randomly divided in 4 groups according to the post ovulation days: G1 (3 days), G2 (4 days), G3 (5 days) and G4 (6 days). Each CL was evaluated in only one day with the color-doppler mode. It was administered the luteolytic agent and ultrasound monitoring in mode-B until the biggest follicle reached 33mm and the endometrial showed level 2 – 3 of edema, the moment of the ovulation induction and ultrasound exams mode-b until ovulation. The luteal and endometrial VP was evaluated in a subjective and objective way. The P4 mensuration was determined by an automatized system of chemiluminescence. The P4 concentration founded was G1 $7,49 \pm 3,07$, G2 $6,49 \pm 1,37$, G3 $9,63 \pm 1,35$, G4 $20,67 \pm 3,37$ ($P < 0,05$), CL VP objective was G1 612 ± 131 , G2 905 ± 153 , G3 1059 ± 95 , G4 1084 ± 267 ($P > 0,05$), CL VP subjectivewas G1 $42,29 \pm 9,23$, G2 $43,44 \pm 3,71$, G3 $49,64 \pm 2,55$, G4 $57,52 \pm 2,17$ ($P > 0,05$). The correlations was: CL VP objective x CL VP subjective ($r = 0,72$), P4 x CL VP subjective ($r = 0,63$) P4 x diameter of CL ($r = 0,12$). Diameter x CL VP objective ($r = -0,03$). Uterine tone x P4, ($r = 0,22$), CL VP objective and uterine tone x CL VP subjective ($r = 0,22$). It was concluded that between the days evaluated, the 6th day post ovulation is the best day to transfer the embryo, because it has the highest plasmatic level of P4, and there is no difference between the CL dimensions, VP of CL and uterine tone. The CL dimensions do not demonstrate its functionality but the vascularization once its related to the P4 production, indicating that the mode-doppler is the most efficient method to evaluate the CL functionality. The subjective analysis has a strong correlation with the objective, been easier and faster.

Key words: Corpus Luteum, progesterone, Doppler, vascularization.

INTRODUÇÃO

O corpo lúteo (CL) é o local de produção da progesterona (P4). A P4 promove o encerramento dos sintomas de estro, mantém a fêmea não receptiva ao macho e prepara o útero para a recepção do embrião. Quando a fêmea se encontra prenhe, há a manutenção do corpo lúteo, mediada pela presença do embrião no lúmen uterino; caso contrário, o corpo lúteo regride sob a ação luteolítica da prostaglandina $F_{2\alpha}$ produzida pelas glândulas endometriais. A secreção contínua de progesterona é essencial para o início e a manutenção da prenhez em fêmeas equinas (PARRYWEEKS et al., 1987; POOL et al., 1987; WAELCHI et al., 1994).

Após a ovulação, as células da granulosa são estimuladas a se transformar em células luteínicas. Estas células invadem o coágulo sanguíneo originando o corpo hemorrágico. Entre os dias 1 e 2 após a ovulação, esta estrutura começa a produzir progesterona e, quando a concentração plasmática supera 1 ng/mL, inicia-se o diestro, desaparecendo as características e o comportamento associados ao estro (NEELY et al., 1979). A concentração de progesterona aumenta rapidamente, atingindo o pico aproximadamente no dia 6 do ciclo, quando mantém um platô. Com a maturação do corpo lúteo, o sangue coagulado é absorvido e substituído por células luteínicas, causando diminuição no tamanho do corpo lúteo. Por volta de 8 a 10 dias, o corpo lúteo decresce de tamanho e aparece no ovário anatomicamente como uma área firme e esponjosa dentro do estroma ovariano. O corpo lúteo maduro produz de 8 a 10 ng/mL de progesterona até aproximadamente 14 e 15 dias após a ovulação, quando sofre luteólise. Após a lise do CL, o nível de progesterona diminui rapidamente em 1 a 2 dias para menos de 1 ng/mL e a égua retorna ao estro (HUGHES et al., 1972).

Apesar da evidente importância da existência e funcionalidade do CL durante o ciclo estral e a gestação, a presença e o estágio da glândula luteínica não podem ser avaliados com precisão através de palpação retal. As dosagens de progesterona representam um meio eficiente para indicar a atividade da glândula luteínica, porém não podem ser utilizadas para uma avaliação imediata. Outra possível análise é por ultrassonografia Modo-B, em tempo real detectando e avaliando o desenvolvimento folicular e de corpos lúteos, sendo analisados pelo tamanho, forma e características de ecogenicidade (PIERSON e GINTHER, 1984; KAHN, 1994). Além desses aspectos atualmente pode-se utilizar a ultrassonografia Doppler a qual demonstra ser uma alternativa efetiva e prática para avaliação não invasiva e em tempo real da perfusão sanguínea do trato reprodutivo das éguas (GINTHER et al., 2007).

Levando-se em consideração que o desenvolvimento, regressão e funcionalidade luteal estão estritamente relacionados com o rápido desenvolvimento e regressão de um extenso sistema vascular local, a US Doppler é de grande valia para a avaliação do status funcional do

CL. Uma íntima relação entre a perfusão sanguínea luteal e a função secretora do CL equino foi descrita por Ginther et al. (2007a, b, 2008), que descreve que há um aumento simultâneo da vascularidade luteal e da concentração plasmática de P4 entre os dias D1 e D6, enquanto que a luteólise funcional é acompanhada por uma diminuição progressiva na perfusão sanguínea do CL (GINTHER et al., 2007b, 2008).

Portanto, objetivou-se correlacionar a produção de P4 com o aporte sanguíneo do CL por ultrassonografia Doppler e suas dimensões; determinar o melhor dia para inovulação de embriões através da taxa de P4, tônus uterino, perfusão vascular e dimensões do CL nos dias mais utilizados para inovulação de embrião em um programa comercial; e validar o método de avaliação subjetiva da perfusão vascular do CL por ultrassonografia Doppler.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado durante a estação reprodutiva 2014/2015 e 2015/2016 na Fazenda Lagoa do Monteiro localizada no município de Itabaiana-PB, a uma latitude 7° 19' 44" sul e a uma longitude 35° 19' 58" oeste a uma altitude de 58 metros, na região agreste do estado da Paraíba.

Foram utilizadas 30 éguas mestiças, com idade entre cinco a dez anos, pesando 350 a 450 Kg. Foram selecionadas por meio de exame clínico ginecológico, comprovando sua higidez. Os animais foram mantidos a pasto de *Panicum maximum*, cultivar mombaça, com água e sal mineral *ad libitum*.

O experimento teve início com a aplicação de 7,5 mg de dinoprost-trometamina, via intramuscular (IM) e monitoramento ultrassonográfico modo-B até que o maior folículo atingisse 33 mm e o endométrio apresentasse edema 2 ou 3, quando foi realizado a indução da ovulação com 1500mg de acetato de deslorelina (Sincrorelín®, Ouro fino Saúde Animal, Brasil) (IM), seguindo com os exames ultrassonográficos modo-B, diariamente, até a ovulação ser detectada.

As 30 éguas foram divididas aleatoriamente entre 4 grupos, de acordo com os dias pós ovulação: G1(3 dias) 3 éguas, G2 (4 dias) 8 éguas, G3 (5 dias) 13 éguas e G4 6 éguas (6 dias), sendo estes dias escolhidos por serem os dias mais utilizados para realização da transferência de embriões em programas comerciais. Cada receptora teve seu CL avaliado em um único dia, com o modo Color-Doppler, de acordo com o grupo selecionado. Para os exames ultrassonográficos foi utilizado o aparelho S2V, Sono Scape Co, Ltda., China, equipado com Transdutor transretal linear de 10-5 Mhz.

A área (mm^2) foi mensurada a partir de uma imagem fixa em modo-B, através das ferramentas de mensuração (elipse) disponíveis no aparelho de ultrassom, os diâmetros luteais foram determinados de acordo com Ginther et al., (1995).

A avaliação perfusão vascular (PV) luteal foi realizada inicialmente de maneira subjetiva considerando o percentual de tecido luteal com sinais Doppler coloridos durante o exame contínuo de no mínimo um minuto, conforme descrito e validado por Ginther et al., (2007), a avaliação da PV do endométrio foi pontuada em escores de 1 a 4, sendo 1 menor vascularização e 4 máxima vascularização.

Posteriormente, realizou-se a análise objetiva, com intuito de validar o método subjetivo. Foram selecionadas três imagens do CL de cada exame com maior quantidade de sinais coloridos na área luteal e salvas em formato BMP, utilizando-se o programa Adobe PhotoShop 5.5 (Adobe Systems, San Jose, CA). O número total de pixels e a intensidade foram gerados pelo programa ImageJ 1.31v (National Institutes of Health, Bethesda, MD). A quantidade de pixels coloridos foi transformada em área luteal vascularizada seguindo a fórmula: 1 pixel colorido corresponde a área de 0,0465 mm. Para a análise estatística utilizou-se a média do resultado da análise das três imagens. Para a avaliação da correlação entre as variáveis, foi levado em consideração os dados de todos os animais independente dos grupos.

O tônus uterino foi avaliado pelo mesmo operador em todos os animais, observando a firmeza ao toque pontuando de 1 a 4 sendo 1 muito flácido e 4 tônus máximo como descrito por Hayes e Ginther (1986). A coleta sanguínea foi realizada por venopunção da jugular, com auxílio de tubo Vacuette[®] com acelerador de coágulo (SiO_2) de 4 mL e agulha 25x8 múltipla com capa de borracha. A mensuração de P4 foi determinada por um sistema automatizado de quimioluminescência (Immulin[®] 103, Siemens Healthcare Diagnostics Ltd., Los Angeles, 104 CA, USA) utilizando um imunoensaio competitivo que se baseia na tecnologia de 105 quimioluminescência direta, com uma sensibilidade analítica de 0,2 ng/mL e uma precisão 106 intra-ensaios de 6,3 a 16%, e precisão inter-ensaios de 5,8 a 16%.

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SPSS 16.0 empregando-se a análise de variância (ANOVA). Para todas as análises, os valores foram considerados significativos ($P < 0,05$). Antes das análises, dados percentuais para vascularização do corpo lúteo na análise subjetiva, foram transformados em arco seno. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão. Uma vez que os dados não foram distribuídos normalmente, correlações entre a concentração de P4 e área do CL, pixel de cor e área do CL, e os outros dados foram examinadas usando o coeficiente de correlação de Pearson.

RESULTADOS

Os resultados da análise de P4, dimensões do CL e PV do CL e endométrio nos grupos estudados encontram-se descritos na tabela 1, na qual observou-se G1 $7,49 \pm 3,07$; G2 $6,49 \pm 1,37$; G3 $9,63 \pm 1,35$; G4 $20,67 \pm 3,37$ ($P < 0,05$). A PV CL objetiva foi de G1 612 ± 131 ; G2 905 ± 153 ; G3 1059 ± 95 ; G4 1084 ± 267 ($P > 0,05$). A PV CL subjetiva foi de G1 $42,29 \pm 9,23$; G2 $43,44 \pm 3,71$; G3 $49,64 \pm 2,55$; G4 $57,52 \pm 2,17$ ($P > 0,05$). Ao avaliar estes dados percebe-se que os mesmos não apresentaram diferença estatística, porém apresentaram diferença entre os grupos.

Quanto as dimensões do CL foram observadas a área G1 $10,24 \pm 0,7$, G2 $7,6 \pm 0,75$, G3 $7,4 \pm 0,72$, G4 $7,9 \pm 1,29$; o diâmetro G1 $35,13 \pm 0,97a$, G2 $31,38 \pm 1,48$, G3 $30,83 \pm 1,58$, G4 $31,21 \pm 2,27$, ($P > 0,05$), não sendo possível observar uma linha de crescimento entre os grupos.

PV do endométrio na análise subjetiva foi G1 $2,66 \pm 0,33$, G2 $2,25 \pm 0,25$, G3 $1,92 \pm 0,27$, G4 $1,33 \pm 0,21a$, ($P > 0,05$) e na análise objetiva da área de pixel coloridos foi de G1 $145,71 \pm 35,89$, G2 $196 \pm 49,9$, G3 $206,9 \pm 74,02$, G4 $288,24 \pm 22,56$, ($P > 0,05$).

Tabela 1: Análise de Progesterona (P4), Dimensões do Corpo Lúteo (CL) e Perfusão Vascular (PV) do CL e endométrio nos grupos estudados

VARIÁVEIS	G1 (D3)	G2 (D4)	G3 - (D5)	G4 (D6)
P4	$7,49 \pm 3,07$ a	$6,49 \pm 1,37a$	$9,63 \pm 1,35$ a	$20,67 \pm 3,37$ b
PV Objetiva	612 ± 131 a	$905 \pm 153a$	1059 ± 95 a	1084 ± 267 a
PV CL Subjetiva	$42,29 \pm 9,23$ a	$43,44 \pm 3,71a$	$49,64 \pm 2,55a$	$57,52 \pm 2,17$ a
Área CL	$10,24 \pm 0,7$ a	$7,6 \pm 0,75a$	$7,4 \pm 0,72$ a	$7,9 \pm 1,29$ a
Diam. CL	$35,13 \pm 0,97$ a	$31,38 \pm 1,48a$	$30,83 \pm 1,58$ a	$31,21 \pm 2,27$ a
PV endométrio	$2,66 \pm 0,33$ a	$2,25 \pm 0,25a$	$1,92 \pm 0,27$ a	$1,33 \pm 0,21$ a
Subjetiva				
PV do endométrio	$145,71 \pm 35,89$ a	$196 \pm 49,9$ a	$206,9 \pm 74,02$ a	$288,24 \pm 22,56$ a
Objetiva				

Letras diferentes na mesma linha ($P < 0,05$).

Tabela 2: Correlações entre Progesterona (P4), Perfusão Vascular (PV) do Corpo Lúteo (CL) objetiva, PV CL Subjetiva e Dimensões do CL

VARIÁVEIS	CORRELAÇÃO
PV Objetiva x PV subjetiva	0,72
P4 x PV CL Objetiva	0,54
P4 x PV CL Subjetiva	0,63
P4 x Diâmetro CL	0,12
P4 x Área CL	-0,12
P4 x PV endométrio	-0,33
Diâmetro CL x Área do CL	0,98
Diâm. CL x PV CL Obj.	-0,03
Área CL x Pixel Obj.	-0,06
Tônus x P4	0,22
Tônus x Diâm.	-0,15
Tônus x Pixel Obj.	0,23
Tônus x Pixel Subj.	0,22

As correlações foram realizadas utilizando os dados de todos os grupos, nas quais se observou uma forte correlação entre o PV CL objetiva e PV CL subjetiva ($r = 0,72$), validando a análise subjetiva, que é mais pratica e rápida de ser realizada.

Ao avaliar as correlações com o P4 obtém-se uma forte correlação com a PV CL objetiva e PV CL subjetiva ($r = 0,54$ e $r = 0,6343$) respectivamente; fraca correlação com as dimensões, diâmetro ($r = 0,12$) e área do CL ($r = -0,12$); e moderada negativa com a PV endométrio ($r = -0,33$). Esses dados demonstram não existir interferência do tamanho do CL no índice de P4 circulante; forte relação entre a vascularização e a produção de P4; e que o aumento da concentração de P4 interfere negativamente na vascularização do endométrio.

Analisando as dimensões do CL observamos: uma forte correlação entre o diâmetro e a área ($r = 0,98$), uma correlação inexistente com o PV CL objetivo, diâmetro ($r = -0,03$) e área ($r = -0,06$), demonstrando não existir interferência das dimensões na vascularização do CL.

Ao avaliar as correlações entre o tônus uterino e as demais variáveis foi observado: moderada positiva ($r = 0,22$) com a concentração plasmática de P4; fraca negativa ($r = -0,15$) com o diâmetro; moderada positiva com a PV CL objetiva e PV CL subjetiva ($r = 0,22$ e $r =$

0,23) respectivamente.

DISCUSSÃO

Analisando a Tabela 1, observa-se um crescimento de P4 entre os grupos, havendo diferença estatística ($p < 0,05$) no G4 que corresponde ao 6º dia pós ovulação, o que corroborando com Ginther et al., (2007), Ginther et al., (2008) e Bollwein et al., (2002a) os quais descreveram que a produção de progesterona atinge os valores máximos no 5º dia e se mantêm constantes até o dia 11º pós ovulação, devido a uma rápida proliferação das células endoteliais e o estabelecimento de uma densa rede de capilares, que ocorre durante a fase luteal inicial e intermediária, sendo necessária para síntese e secreção de P4.

Esta proliferação capilar foi demonstrada em nosso experimento, por uma forte correlação entre os níveis de P4 e a PV CL objetiva e subjetiva ($r = 0,54$ e $r = 0,63$), respectivamente, atestando ainda que a atividade funcional do CL não depende de sua dimensão, uma vez que não houve relação entre a área luteal e a concentração plasmática de P4 ($r = -0,12$). Estudo de Romano, (2013), apresentou alta correlação entre a PV luteal subjetiva e a concentração plasmática de P4 ($r=0,94$), também encontrando uma fraca concentração plasmática da área do CL com P4 ($r=0,13$). Dados conflitantes com os resultados de Brogan et al., (2015), que obteve correlação semelhante entre P4 e a área do CL ($r = 0,45$) e a vascularização ($r = 0,39$), como ocorreu em estudo envolvendo vacas de leite, que Herzog et al., (2010) descreve o que o fluxo sanguíneo foi um superior ao tamanho luteal como indicador dos níveis de P4, quando Lüttgenau et al., (2011) indica não haver associação entre estas variáveis.

Para transferência de embriões a janela de ovulação de 1 dia antes (d - 1) e 3 dias após (d+3) da égua doadora, sendo - antes da ovulação da doadora e + depois (STOUT, 2003), o que é confirmado por nosso estudo que observa maiores níveis de P4, $20,67 \pm 3,37$ ($P < 0,05$), no 6º dia pós ovulação, o que corresponderia ao d+2. No entanto, outros autores mostraram que taxas aceitáveis de prenhez podem ser alcançadas, utilizando uma janela mais ampla, como descrito por Wilshire e Allen (2009) que transferiram embriões dia 10 (Dia 0 = ovulação) para receptoras que ovularam um dia antes da transferência (d+7) obtendo 37,5% (3/8) de taxa de prenhez e Wilsher et al. (2010) que alcançou taxas de prenhez entre 100% (08/08) e 63% (08/05) ao transferir embriões Dia 10 para receptoras com graus de sincronia variando entre -2 e +6 dias.

A taxa de P4 obtidos neste trabalho estão de acordo com a citação de Arruda et al., (2001), que registraram níveis de P4 entre 4,0 e 12,0 ng/mL para éguas em diestro. Portanto, os níveis plasmáticos de progesterona apresentados e avaliados no presente trabalho podem ser

aceitos como normais para fêmeas equinas, porém estando os níveis máximos do 6º dia superiores aos supracitados, mas no intervalo relatado por Allen, (2001), que obteve de 12-20 ng/mL entre os dias 5 e 10 após a ovulação.

Quando avaliado a correlação entre o tônus uterino e a concentração observou-se uma relação moderada positiva ($r = 0,22$); PV CL objetiva ($r = 0,23$) e PV CL subjetiva ($r = 0,22$). Estes dados são reforçados por McCue et al., (1999) que encontraram uma relação entre tônus uterino bom e excelente com concentração plasmática de progesterona mais alta. No entanto, esta relação não foi observada por Alonso (2007), mesmo descrevendo uma maior taxa de prenhez em receptoras com maior tônus.

Ao avaliar a PV do endométrio, não foi observado diferença estatística entre os grupos, porém é percebido uma diminuição deste índice por volta do 5º dia, como reportado por Ignácio et al., (2012) e Bollwein et al., (1998) e Ginther, et al., (2007) que descrevem que entre o 5º e 6º dia é indicado um declínio desta vascularização que segue até o 10º dia, voltando a aumentar entre o 10º e o 13º dia, sendo também observado nos dados da correlação ($r = -0,33$) moderada negativa, demonstrando-se inversamente proporcional, quanto maior P4 menor vascularização no endométrio.

CONCLUSÃO

Conclui-se que entre os dias analisados o 6º dia pós - ovulação é o melhor dia para realizar a inovulação de embrião, por possuir o maior nível plasmático de P4, não havendo diferença entre as dimensões do CL, a PV do CL e o tônus uterino. As dimensões do CL não demonstram sua funcionalidade e sim a vascularização por estar relacionada com a produção de P4, indicando que o Modo - Doppler é o método mais eficiente para avaliação da funcionalidade do CL. A análise subjetiva possui forte correlação com a objetiva, sendo de fácil e rápida realização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, W.R. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. **Reproduction in domestic animals**, v. 36, n. 3-4, p. 121-31, 2001.

ALONSO, M.A. Efeito das características uterinas e dia do ciclo na taxa de prenhez e níveis séricos de progesterona em éguas candidatas à receptora de embrião. **Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

ARRUDA, R.A.; VISINTIN, J.A.; FLEURY, J.J.; GARCIA, A.R.; MADUREIRA, E.H.; CELEGHINI, E.C.C.; NEVESNETO, J.R. Existem relações entre tamanho e morfo ecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultrassom e os teores de progesterona na plasmática em receptoras de embriões equinos? **Brazilian Journal of Veterinary Animal Science**, v.38,n.5,p.233-239, 2001.

BOLLWEIN, H.R.; MAYER, F.W.; STOLLA R.: Luteal blood flow during the estrus cycle in mares. **Theriogenology** 57, 2043-2051, 2002a.

BOLLWEIN, H.; MAIERL, J.; MAYER, R.; STOLLA, R. Transrectal color doppler sonography of the uterine in cyclic mares. **Theriogenology**, v.49,p.1483-1488,1998.

BROGAN, P.T.; HENNING, H.; STOUT, T.A.E.; RUIJTER-VILLANI, M.. Relationship between colour flow Doppler sonographic assessment of corpus luteum activity and progesterone concentrations in mares after embryo transfer, **Anim. Reprod. Sci.**, 2015.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Effect of prostaglandin F2alpha on ovarian, adrenal, and pituitary hormones and on luteal blood flow in mares. **Domest Anim Endocrinol**, v.32, p.315-328, 2007a.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O., UTT, M.D., BEG, M.A.. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Anim Reprod Sci**, v.99, p.213-220, 2007b.

GINTHER, O.J.; RODRIGUES, B.L., FERREIRA, J.C., ARAUJO, R.R., BEG, M.A.. Characterisation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF2alpha (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. **Reprod Fertil Dev**, v.20, p.684-693, 2008.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.J.; GASTAL, M.O.; UTT, M.D.; BEG, M.A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Anim. Reprod. Sci.** 99, 213–220, 2007.

GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging and animal reproduction : horses Cross Plains , WI : **Equiservices**, Book2, 1995.

HAYES, K.E.N.; GINTHER, O.J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology**, v.25,n.4,p.581-590, 1986.

HERZOG, K.; BROCKHAN-LUDEMANN, M.; KASKE, M.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H.; Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology** 73, 691–697, 2010.

HUGHES, J.P.; STABENFELDT, D.H.; EVANS, J.W. Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, p. 119-152, 1972.

IGNÁCIO, F.S.; DE SIQUEIRA CANESIN, H.; PANTOJA, J.C.F.; ROMANO, R. M.; NOVAES FILHO, L.F.; FERREIRA, J.C.; DE MEIRA, C. Uterine hemodynamic evaluation of the beginning of diestrus in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, 32(7), 406-407, 2012.

KÄHN, W. Veterinary reproductive ultrasonography. 2.ed. London, **Mosby-Wolfe**, 256 p. 1994.

LÜTTGENAU, J.; ULBRICH, S.E.; BEINDORFF, N.; HONNENS, A.; HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.** 125, 20–29, 2011.

MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D.K.; KEITH, S.L.; SQUIRES, E.L. Equine embryo transfer: influence of endogenous progesterone concentrations on pregnancy outcome. **Theriogenology**, v., n., p.267, 1999.

NEELY, D.P.; KINDAHL, H.; STABENFELDT, G.H.; EDQVIST, L.E.; HUGHES, J. P. Prostaglandin release patterns in the mares. Physiological, pathophysiological and therapeutic responses. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 181-189, Supplement 27, 1979.

PARRYWEEKS, L.C.; HOLTAN, D.W. Effect of altrenogest on pregnancy maintenance in unsynchronised equine embryo recipients. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 433-843. Supplement 35, 1987.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, v. 21, n. 3, p. 495-504, 1984.

POOL, K.F.; WILSON, J.M.; WEBB, G.W.; KRAEMER, D.C.; POOTER, G.D.; EVANS, J.W. Exogenous hormone regimens to utilize successfully mares in dioestrus (Days 2-14 after ovulation) as embryo transfer recipients. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 429-432. Supplement 35, 1987.

ROMANO, R.M. Influência da gonadotrofina coriônica humana sobre a hemodinâmica de folículos pré-ovulatórios e desenvolvimento luteal em águas. 88 f. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2013.

STOUT, T.A.E. Selection and management of the embryo transfer donor. **Pferdeheilkunde**; 6:685– 8, 2003.

WÄELCHLI, R.O.; KÄNZIG, M.; DÖBELI, M.; RÜSCH, P. Condition of the uterine cervix in relation to cycle stage, plasma progesterone and estradiol - 17 β concentrations in the mare. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 29, n. 6, p. 404- 410, 1994.

WILSHER, S.; CLUTTON-BROCK, A.; ALLEN, W.R. Successful transfer of day 10 horse embryos: Influence of donor-recipient asynchrony on embryo development. **Reproduction**; 139:575– 85, 2010.