

MÁRLON DE VASCONCELOS AZEVEDO

**AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DOPPLER DA
VASCULARIZAÇÃO OVARIANA DE ÉGUAS SUBMETIDAS À
DUPLA OVULAÇÃO**

RECIFE

2016

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

MÁRLON DE VASCONCELOS AZEVEDO

AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DOPPLER DA
VASCULARIZAÇÃO OVARIANA DE ÉGUAS SUBMETIDAS À
DUPLA OVULAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de **DOUTOR** em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Fernandes de Lima.

RECIFE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DOPPLER DA
VASCULARIZAÇÃO OVARIANA DE ÉGUAS SUBMETIDAS À
DUPLA OVULAÇÃO

Tese de Doutorado elaborada por

MÁRLON DE VASCONCELOS AZEVEDO

Aprovada em 29 / 02 / 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr. PAULO FERNANDES DE LIMA
Orientador – Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Prof Dr. MARCOS ANTONIO LEMOS DE OLIVEIRA
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. CLÁUDIO BARTOLOMEU COUTINHO
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dr^a. ADRIANA TAVEIROS WANDERLEY
Médica Veterinária da Polícia Militar do Estado de Pernambuco

Dr. LEOPOLDO MAYER FREITAS NETO
Médico Veterinário Autônomo

Ficha catalográfica

C837a Azevedo, Márlon Vasconcelos

Avaliação ultrassonográfica doppler da vascularização ovariana de éguas submetidas a dupla ovulação / Márlon Vasconcelos Azevedo. – Recife, 2016.

80 f. : il.

Orientador: Paulo Fernandes de Lima.

Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2016.

Inclui referências e apêndice(s).

1. GnRH 2. Folículo 3. Vascularização 4. Super ovulação
5. Corpo Lúteo I. Lima, Paulo Fernandes de, orientador II. Título

CDD 636.089

DEDICATÓRIA

“ Aos meus pais, de famílias humildes de Monteiro, no Cariri paraibano, família de bancários nômades, que iniciou no Banco do Brasil servindo café e chegou a Superintendente Estadual, que já foi trabalhar com roupa emprestada, palitô no ombro porque não servia, que acordava de madrugada para deixar tudo pronto da varrida da casa ao jantar, só para os meninos poderem estudar. Tudo com um único propósito, vencer na vida e dar oportunidade a seus filhos. Vocês merecem muito mais, mas é com muito orgulho, que dedico estes anos de estudo. Muito Obrigado.”

*Valdemir Azevedo Pereira e
Maria Veroneide de Vasconcelos Azevedo*

“Ao mestre, que exerce o magistério como sacerdócio, que dedicou toda a sua vida para doar aos alunos o que ele tem de melhor: sabedoria e humildade. Muito obrigado Professor Paulo Fernandes de Lima. Que me deu a honra de ser seu aluno não só por 10 anos, mas por uma vida . Meu segundo PAI, muito obrigado!”.

Paulo Fernandes de Lima.

AGRADECIMENTOS

Deus, uni presente, com as palavras de sua sagrada escritura, escritas por Davi, após estar diante do Rei Filisteu, quando fingiu loucura e foi salvo.

Salmo 33:

2 Bendirei continuamente ao Senhor,
seu Louvor não deixará meus lábios,
3 Glorie-se minha alma ao Senhor;
ouçam-me os humildes, e se alegrem.

4 Glorificai comigo o Senhor,
justos exaltemos o seu nome.

5 Procurei o Senhor e me atendeu,
livrou me de todos os temores,

6 Olhai pra ele a fim de vós alegrardes,
e não se cobrir de vergonha o vosso
rosto.

7 Vede, este miserável clamou e o Se-
nhor o ouviu,
de todas as angústias o livrou.

8 O anjo do Senhor acampa
em redor dos que o temem, e os salva.

9 Provai e vede que o Senhor é bom.
feliz o homem que se refugia junto dele.

10 Reverenciai o Senhor, vós, seus fiéis,
porque nada falta aquele que o temem.

11 Os poderosos empobrecem e passam
fome,
mas aos que buscam o Senhor nada lhes
falta.

12 Vinde, meus filhos, ouvi-me:
eu vos ensinei o temor do Senhor.

13 Qual é o homem que ama a vida,
e deseja longos dias para gozar de felici-
dade?

14 Guarda tua língua do mal,
e teus lábios das palavras enganosas.

15 Aparta-te do mal e faz o bem;
busca a paz e vai ao seu encaço.

16 Os olhos do Senhor estão voltados
para os justos
e seus ouvidos atentos aos seus clamo-
res.

17 O senhor volta a sua face irritada con-
tra os que fazem o mal,
para apagar da terra a lembrança dele.

18 Apenas clamaram os justos, o Senhor
os atendeu e

os livrou de todas as suas angústias

19 O Senhor está perto dos contritos de
coração,

e salva os que têm o espírito abatido.

20 São numerosas as tribulações do jus-
to,

mas de todas o livra o Senhor.

21 Ele protege cada um de seus osso:
nem um só deles será quebrado.

22 A malícia do ímpio o leva á morte,
e os que odeiam o justo serão castiga-
dos.

23 O Senhor livra a alma de seus servos;
não será punido quem a ele se acolhe.

Agradeço a minha *Amada Esposa Natália Matos Souza Azevedo*, que me acalenta, anima e afaga em todos os momentos, com sua voz doce e palavras meigas. Que já enfrentou comigo as mais diversas batalhas, sendo sempre meu cajado minha segurança. Te amo muito.

A minha *LINDA FILHA Marília Matos Azevedo*, que apesar de não tê-la visto quando escrevi estas palavras, tenho certeza que é o maior presente que Deus poderia me dar, que desde o dia que planejamos concebê-la já te amava muito. Me esforçarei ao máximo para ser um bom pai, carinhoso, compreensivo e amável.

A meus *Pais, Valdemir Azevedo Pereira e Maria Veroneide de Vasconcelos Azevedo*, que sempre me deram forças para seguir meu caminho, me ajudando e aconselhando, sendo minha rocha em todos os momentos. Quem me deu discernimento e honestidade para enfrentar a vida sempre de cabeça erguida e ser uma homem de bem. Quem desde a primeira infância me ensinou a amar a Deus acima de todas as coisas e ao próximo como a si mesmo. Amo Vocês.

A meus irmãos, *Max, Thais e Breno*, meus guias, que nunca me faltaram e sempre me protegeram em cada passo da minha vida, que me deram lindos sobrinhos(as) e cunhadas(os), que são como irmãs. *Emilene*, a mais próxima, que sempre me viu como irmão, minha conselheira. Amo Vocês.

Meus *Lindos Sobrinhos: Maria Luiza, João Pedro, Pedro e Arthur*, obra prima do Senhor. Muito obrigado por existirem.

Meus *Tios e Primos*, nosso clã, onde todos têm título de Grão mestre, todos tem sabedoria e força pra dar e vender.

Meus Mestres:

Paulo Fernandes de Lima, que me criou e tornou real a frase: O professor é um pai. Foi ele que guiou meus passos na minha vida acadêmica, desde que cheguei na sua sala, com Natália, na época minha amiga, para castrar dois cavalos, nunca mais sai. E já foram tantas aulas práticas, projetos de extensão, Pibic, monitoria, mestrado e doutorado. Sempre me dando grandes oportunidades e me aconselhando. Meu Mestre, meu Professor, quem me tomou como filho e me formou MÉDICO VETERINÁRIO.

Marcos Antônio Lemos de Oliveira, que sempre me dá os puxões de orelha, do jeito dele, mas sempre querendo nosso melhor e dizendo acorda...

Claudio Bartolomeu Coutinho, nosso orientador, sempre disposto a tirar nossas dúvidas sempre com muito zelo, atenção e paciência.

Joana D’Arc, Alcir, Sônia e Guiomar, nossos técnicos e funcionários, que desde o início da graduação estavam do nosso lado, nos mostrando o melhor caminho a trilhar, nos acompanhando em aulas práticas e experimentos, grandes amigos ... irmãos.

Aos que nos deixaram, como disse, *Arriano Suassuna*:

“Encontrou-se com o único mal irremediável, aquilo que é a marca do nosso estranho destino sobre a terra, aquele fato sem explicação que iguala tudo o que é vivo num só rebanho de condenados, porque tudo o que é vivo morre”

Tia Valdeluce

Vovô Pedro

Vovó Da Paz

Vovô Ozael

Vovó Teonas

Tia Socorro

Que uma vida foi pouco para convivermos. Seus ensinamentos serão eternos!

A minha terra **Itabaiana**, terra de poetas *Zé da Luz, Sivuca e Jessier Quirino*, a quem homenageio, com os versos que de tão simples são geniais:

A TERRA CAIU NO CHÃO

Zé da Luz

Visitando o meu sertão,
que tanta grandeza encerra,
trouxe um pedacinho de terra,
com muita satisfação.

Fiz isso na intenção,
como fez Pedro Segundo,
de quando eu deixasse o mundo,
levá-lo no meu caixão!

Chegando ao Rio pensei:
guardá-lo só para mim,
e num saquinho de brim,
essa relíquia encerrei!

Com carinho e com cuidado,
numa ripa do telhado,
o saquinho pendurei...

Uma doença apanhei...
E vendo bem próxima a morte,
lembrando as terras do norte,
do saquinho me lembrei...

Que cruel desilusão!!!
As traças, sem coração
meteram os dentes no saco,
fizeram um grande buraco...
E a terra caiu no chão!!!...

RESUMO

Este estudo foi dividido em três experimentos, teve com objetivo induzir ovulações múltiplas em éguas utilizando baixas doses de GnRH (deslorelina); avaliar a viabilidade folicular após tratamento superovulatório através do acompanhamento ultrassonográfico doppler dos folículos subordinados e dominante; detectar alterações vasculares que precedem o momento da divergência. Correlacionar a produção de P4 com a vascularização 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, avaliar a interferência da vascularização na taxa de prenhez. No experimento 1, Foram utilizadas seis éguas doadoras de embrião da raça Mangalarga Machador. O G1 iniciou com a aplicação do luteolítico e monitoramento diário com o Modo-B, acrescentando o uso do Modo-Doppler, a partir de folículos com 25 mm até a ovulação. A indução de ovulação e a inseminação artificial foram realizadas no mesmo momento, quando o folículo atingia de 33 a 35 mm de diâmetro e edema uterino grau 2 a 3. O G2 diferenciou-se do G1 pelo tratamento superovulatório, a partir de folículo >23mm e o >18mm, até o momento da indução de ovulação. O percentual de éguas com ovulações múltiplas no G1 0% (0/6) e no G2 83,3% (5/6) ($P < 0,05$). Taxa de crescimento folicular G1 $2,79 \pm 0,34$, G2 FD $3,37 \pm 0,55$, G2 F-cD $2,64 \pm 0,82$ ($P > 0,05$). A vascularização da parede folicular, G1 FD $31,93 \pm 10,11$, G2 FD $31,33 \pm 8,82$ e do G2 F-cD $32,54 \pm 9,23$ ($P > 0,05$) e do G1 Fsub, $12,92 \pm 0$ ($P < 0,05$). O Experimento 2 foram utilizadas apenas éguas inovuladas, 15 éguas, divididas em Prenhas (G1) e Vazias (G2), a inovulação ocorreu entre o 4º e 6º dia pós ovulação e o diagnóstico de prenhez quando o embrião estava com 16 dias. O índice de Prenhez encontrado foi de 53,33%, a concentração de P4 foi de G1 $10,64 \pm 1,13$ e G2 $7,19 \pm 3,49$, ($P > 0,05$). A PV CL objetiva G1 $1216,97 \pm 74,45$ e G2 $661,81 \pm 117,11$, ($P < 0,05$). Na PV CL subjetiva $51,00 \pm 2,07$ e $48,45 \pm 2,15$, ($P > 0,05$), Área do CL G1 $7,66 \pm 0,36$ e G2 $7,41 \pm 0,91$, ($P > 0,05$), diâmetro do CL G1 $31,53 \pm 1,84$ e G2 $30,68 \pm 1,82$, ($P > 0,05$). PV subjetiva endométrio, G1 $1,87 \pm 0,39$ e G2 $2,14 \pm 0,43$, ($P < 0,05$), PV objetiva endométrio, G1 $357,56 \pm 103,93$ e G2 $181,37 \pm 54,60$; tônus uterino $2,75 \pm 0,36$ e G2 $2,57 \pm 0,40$, ($P > 0,05$). Correlação entre P4 e a PV CL objetiva $r = 0,63$ ($P < 0,05$) e com PV CL Subjetiva $r = 0,69$, ($P < 0,05$), entre o PV do CL objetiva e subjetiva $r = 0,66$ ($P < 0,05$). Entre as dimensões do CL e o nível plasmático de P4 obteve-se, Diâmetro CL $r = -0,28$ ($P > 0,05$) e Área do CL $r = -0,20$ ($P > 0,05$). Entre a área e o diâmetro do CL $r = 0,98$ ($P < 0,05$), dimensões do CL com a PV CL Objetiva $r = 0,03$ ($P > 0,05$). Entre o tônus uterino e o nível plasmático de P4 $r = 0,25$ ($P > 0,05$), com o PV CL Objetivo $r = 0,29$ ($P > 0,05$) e com o diâmetro do CL $r = -0,29$ ($P > 0,05$). No experimento 1, Conclui-se que a administração de GnRH em baixa dose é eficiente em induzir dupla ovulação e consequente aumento na taxa de embriões recuperados, que interferiu positivamente no crescimento do folículo dominante e co-dominante e na taxa de vascularização do folículo co-dominante. Em relação as alterações vasculares que precedem o momento da divergência, constatou-se que há diminuição da vascularização no folículo subordinado, 24h antes da divergência e aumento na vascularização do folículo dominante. No experimento 2 Conclui-se que a PV CL é indicativo de prenhez por refletir a concentração plasmática de P4, sendo a PV CL a melhor análise para seleção de receptoras tendo em vista que a concentração plasmáti-

ca de P4 tem correlação significativa com a PV CL objetiva e subjetiva e não apresenta correlação significativa com as dimensões do CL e com o Tônus uterino. A avaliação subjetiva é eficaz, sendo um método mais prático e em tempo real para determinar a funcionalidade do CL.

Palavras-chave: GnRH, Foliculo, Vascularização, Superovulação, Corpo Lúteo

ABSTRACT

This study divided into three experiments was carried out to induce multiple ovulation in mares using low doses of GnRH (deslorelin); evaluate the follicular viability after superovulation by doppler ultrasound monitoring of subordinate and dominant follicles; detect vascular abnormalities that precede the time of divergence. Correlate the production of P4 with the vascularization of the CL by Doppler ultrasonography and its dimensions; determine the best day to embryo transfer embryos through P4 rate, uterine tone, vascular perfusion and dimensions of CL, to evaluate the interference of vascularization in pregnancy rate. In experiment 1, it was used six donor mares embryo Mangalarga Machador race. The luteolitic G1 and daily monitoring with the B-mode, adding the use of the Doppler mode, from follicles 25 mm up to ovulation. The induction of ovulation and insemination are performed at the same time when the follicle reached 33- to 35 mm in diameter and uterine edema grade 2 to 3. The differentiated G2 to G1 by superovulation, starting follicle > 23 mm and the > 18mm, up to the time of ovulation induction. The percentage of mares with multiple ovulations in G1 0% (0/6) G2 and 83.3% (5/6) (P <0.05). follicular growth rate G1 2.79 ± 0.34 , 3.37 ± 0.55 FD G2, G2 F-cd 2.64 ± 0.82 (P > 0.05). The vascularization of the follicle wall, G1 FD 31.93 ± 10.11 , 31.33 ± 8.82 FD G2 and G2 F-cd 32.54 ± 9.23 (P > 0.05) and G1 fsub, 0 ± 12.92 (P <0.05). In experiment 2, they have been used only in ovulated mares, 15 mares, divided in pregnant (G1) and Empty (G2), embryo transfer took place between the 4th and 6th day after ovulation and pregnancy diagnosis when the embryo was 16 days. The pregnancy rate was found to be 53.33%, the concentration of P4 is G1 and G2 10.64 ± 1.13 7.19 ± 3.49 (P > 0.05). PV CL lens G1 and G2 1216.97 ± 74.45 661.81 ± 117.11 (P <0.05). In PV CL subjective 51.00 ± 2.07 and 48.457 ± 2.15 (P > 0.05), CL area G1 7.66 ± 0.36 and 7.41 ± 0.91 G2 (P > 0.05), diameter CL G1 31.53 ± 1.84 and 30.68 ± 1.82 G2 (P > 0.05). Correlation between P4 and PV objective CL $r=0,63$ (P <0,05) and PV CL Subjective $r=0,69$, (P <0,05), between the CL PV objective and subjective $r =0,66$ (P <0,05). Among the dimensions of the plasma level CL and P4 are obtained, CL diameter $r= -0,28$ (P >0,05) and area CL $r= -0,20$ (P >0,05). Among the area and the diameter CL $r=0,98$ (P <0,05), with the dimensions CL CL Lens PV $r=0,03$ (P >0,05) with the uterine tone and P4 serum levels $r=0,25$ (P >0,05) and Purpose with the PV CL $r=0,29$ (P >0,05) and the diameter CL $r=-0,29$ (P >0,05). In experiment 1, it concluded that the GnRH administration in low dose is effective in inducing double ovulation and consequent increase in the rate of recovered embryos, which had a positive influence on the growth of the dominant follicle and co-dominant and vascularization rate of co follicle - dominant. Regarding the vascular changes that precede the time of divergence, it was found that there is a decrease in the vascularization cross follicle, 24 h

before the divergence and increase in vascularization of the dominant follicle. Referring to the experiment 2 appears that the largest PV CL rate in pregnant recipients on the day of embryo transfer and strong positive correlation between plasma concentration of P4 and vascular perfusion luteal, associated with the absence of dimensional changes of the SC and the uterine tone has moderate correlation with P4 and pregnancy, indicating that the Doppler technology is a more effective method for evaluation of luteal function and the strong correlation between the PV CL objective and PV CL subjective validates this method, It is more practical and easy.

Keywords: GnRH, Follicle, vascularization, superovulation, Corpus Luteum.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

REVISÃO DE LITERATURA :

	Página
Figura 1: Níveis de FSH e Estradiol no ciclo estral. Fonte: AURICH (2011)	7
Figura 2: Níveis de LH, Progesterona e PGF no ciclo estral. Fonte: AURICH (2011)	9
Figura 3: Esquema da variação das ondas sonoras transmitidas e emitidas pelo transdutor em: A – objeto imóvel – reflete a onda com a mesma frequência que foi emitida, B – objeto com movimentação em direção ao transdutor – reflete a onda com frequência maior que a emitida, C – objeto com movimentação em direção contrária ao transdutor – reflete a onda com frequência menor do que a emitida. Fonte: CARVALHO (2009)	14
Figura 4: Imagem ultrassonográfica Doppler - modo espectral, de uma artéria localizada no mesométrio uterino. O cursor Doppler (amarelo) está posicionado sobre o lúmen do vaso sanguíneo para obtenção de um gráfico espectral. A velocidade do pico sistólico (PSV) e velocidade diastólica final (EDV) representam a velocidade máxima e velocidade final de um ciclo cardíaco, respectivamente. Fonte: (GINTHER, 2007).	14
Figura 5: imagem de um Cl, pelo modo Color - Doppler. Fonte: Arquivo pessoal	16
Figura 6: Visão Lateral do suprimento sanguíneo arterial no trato genital da égua. Legenda: cvc V. cava caudal; dca A. circunflexa ílio profunda; eia A. ilíaca externa; iia A. ilíaca interna; ipa A. pudenda interna; oa A. ovariana; ov V. ovarina; ua A. uterina; uboa R. uterino para A. ovariana; ubva R. uterina para A. vaginal; va A. vaginal. Fonte: (GINTHER 2007).	17

Figura 7: Média (\pm e.p.m), para o PI das artérias ovarianas ipsi (●) e contralateral (○) ao folículo dominante ou CL, durante o ciclo estral de éguas com ovulações espontâneas (D0=dia da ovulação) Fonte: Bollwein et al, (2002) 18

Figura 8: Representação esquemática da proposta de modelo de trabalho, ilustrando a relação entre o fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório e serrilhado da granulosa para éguas com uma evacuação normal versus uma evacuação septado prolongada. Fonte: GASTAL, (2011) 22

Figura 9: Média (\pm e.p.m) para área luteal, área de fluxo sanguíneo luteal e concentração plasmática de progesterona durante o ciclo estral de éguas com ovulações espontâneas. Asteriscos indicam aumento ou decréscimo significativo ($P<0,05$) dentro de cada momento. Dia 0 = dia da ovulação. Fonte: Ginther et al., (2007) 26

CAPITULO I:

Figura 1: Demonstrativo do tratamento superovulatório, grupo 2 46

Figura 2: Demonstrativo do tratamento grupo controle 47

Figura 3: Demonstrativo dos exames ultrassonográficos nos dois grupos 47

Figura 4: Crescimento folicular e da vascularização do folículo dominante e subordinado no G1 52

Figura 5: Crescimento folicular e comportamento da vascularização de um ciclo no grupo experimental G2 53

Figura 6: Crescimento dos Índices Doppler Velocimétricos, RI e PI durante o ciclo estral, no Grupo G2 56

Figura 7: Desenvolvimento dos Índices Doppler Velocimétricos, (Veloc.) Velocidade Diastólica Final em cm/s, (PG) Correspondente de pressão em mmHg, (T. desacel) Tempo de desaceleração 56

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPITULO I	
Tabela 1 – Número de ovulações e produção de embrião do G1 e G2	49
Tabela 2 – Crescimento folicular médio e Tamanho médio do folículo no ciclo do G1, G2 Dominante e G2 Co-Dominante	52
Tabela 3 – Vascularização média da parede folicular e média dos índices doppler velocimétricos, RI, PI, Velocidade, Pg, Tempo de desaceleração, PeaKV, AccV, avaliando o Folículos dominante do G1 (G1 FD), Folículo subordinado G1 (G1Fs), Folículo Dominante G2 FD e Folículo co-Dominante G2 (G2 F-cD)	54
CAPITULO II	
Tabela 1 - Análise de P4, Dimensões do CL e PV do CL e endométrio nos grupos estudados	69
Tabela 2 - Correlações entre P4, PV CL objetiva, PV CL subjetiva e dimensões do CL	70

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	
3.1. Histórico da transferência de embrião	5
3.2. Dinâmica folicular e ciclo estral das éguas	5
3.3. Frequência de ovulações múltiplas na égua	10
3.4. Superovulação	10
3.5. Ultrassonografia Doppler	
3.5.1- Histórico e fundamentos da técnica Doppler	13
3.6. Fornecimento de sangue genital na égua	
3.6.1- Artéria uterina	16
3.6.2- Artéria ovariana	16
3.7. Fluxo sanguíneo ovariano durante o ciclo estral na égua	17
3.8. Avaliação do ciclo estral por ultrassonografia Doppler	
3.8.1- Detecção do início do ciclo estral	18
3.8.2- Dominância folicular	20
3.8.3- Predição de ovulação	20
3.8.4- Vascularização do folículo pré-ovulatório em relação a fertilidade	22
3.8.5- Luteogênese e perfusão vascular	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
5. ARTIGOS CIENTÍFICOS	
5.1 CAPÍTULO 1	41
Avaliação ultrassonográfica Doppler da vascularização ovariana de éguas submetidas a um protocolo de indução de dupla ovulação.	
5.2. CAPÍTULO 2	62
Avaliação por ultrassonografia Doppler da vascularização do corpo lúteo e do índice de prenhez de receptoras, em um programa comercial de trans- ferência de embriões.	
6. ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

A equideocultura é a terceira atividade agropecuária que mais emprega no Brasil e vem vivendo uma grande expansão de suas atividades nos últimos anos, sendo hoje responsável pela geração de mais de 4 milhões de empregos diretos, além do surgimento de inúmeras empresas farmacêuticas, que experimentam grande crescimento principalmente no ramo de nutracêuticos.

O nordeste é o grande impulsionador deste desenvolvimento, pois é a vaquejada que reúne mais de 600 animais em apenas uma prova e gera milhões em negócios todo final de semana, prova que está enraizada em nossa cultura, como grande manifestação popular, esta grande movimentação demonstra o poder desta atividade na economia local, tendo em vista que cada cavalo necessita que 3 três pessoas o acompanhem por prova o que totaliza 1800 pessoas envolvidas diretamente com o cavalo, sendo adicionado ainda veterinários, locutores, juízes e vaqueiros do curral, bem como todos os trabalhadores autônomos envolvidos de forma indireta nos serviços e alimentação e produção de arreios e acessórios.

A cidade de Cachoeirinha, situada no agreste pernambucano, tem sua economia baseada na produção do couro e do aço visando sua utilização na equideocultura, assim como Aldeia, distrito de Camaragibe, que possui uma atividade equestre intensiva, com uma relação de 5,6 cavalos por cavaliço, gerando uma importante fonte de receitas com o aluguel de boxes nos centros equestres, tendo como média salarial acima do salário mínimo adotado no Brasil (MANSO et al., 2008).

O Brasil possui um dos maiores rebanhos equinos do mundo. Existem várias associações de raça com número expressivo de criadores e animais. Deve-se salientar que as raças nativas estão em fase de formação e assim, qualquer meio capaz de reduzir o intervalo de gerações e aumentar o número de bons reprodutores e matrizes é de grande valia no aprimoramento de nossos animais (CARVALHO, 2000).

A ultrassonografia desde que foi incorporada à rotina da reprodução equina na década de 80 estabeleceu uma nova dimensão para o controle de diferentes eventos reprodutivos, tais como: acompanhamento da gestação, principalmente durante os primeiros 60 dias, período que ocorrem as maiores perdas embrionárias, evitando assim perda de tempo e dinheiro por parte do criador, além de dar suporte ao profissional para viabilização de técnicas como a inseminação artificial (IA) ou transferência de embriões (TE), acrescidas da sexagem fetal que agrega valores econômicos aos serviços e produtos oferecidos pelo criatório (TAVEIROS, 2008).

Em relação à TE, o Brasil ocupa lugar de destaque na utilização desta técnica ao lado dos Estados Unidos e da Argentina, sendo um dos líderes, realizando em torno de 3.500 transferências por ano, de acordo com levantamento da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS (CARNEIRO, 2005).

A utilização da TE em equinos tem aumentado rapidamente nas últimas duas décadas. Contudo, algumas características biológicas peculiares, assim como problemas técnicos, têm limitado seu amplo uso na espécie equina quando comparado com a espécie bovina (SQUIRES et al., 1999).

A fêmea equina por natureza é monovular, o que significa dizer que a cada ciclo estral, geralmente, uma única ovulação irá ocorrer. A possibilidade de se incrementar o número de ovulações no ciclo estral da égua traz consigo benefícios em potencial, como o aumento no número de oócitos disponíveis para aplicação de diferentes técnicas de reprodução assistida e aumento no número de embriões recuperados em uma única colheita, com consequente redução dos custos do programa de TE (BONIN e ALVARENGA et al., 2009).

A ocorrência de ovulações duplas espontâneas em éguas é um fator que incrementa a recuperação de embriões. Assim sendo, alguns grupos de pesquisa têm se dedicado ao estudo dos fatores responsáveis pela baixa recuperação embrionária em éguas superovuladas e ao desenvolvimento de protocolos que driblem esses fatores, que produzam menos efeitos adversos e promovam estimulação moderada e não excessiva dos ovários (ALVARENGA et al., 2008).

As taxas de recuperação embrionária após lavagem uterina e de prenhez relatadas no Brasil têm variado entre 45,5% a 83,3% segundo relatos de Farinasso (2004); Meira e Henry (1991); Pastorello et al. (1996).

Pesquisas realizadas por Farinasso (2004), utilizando baixa dose de Extrato de Pituitária Equina (EPE), na superovulação obtiveram bons resultados, no entanto existiram dificuldades na produção e padronização do fármaco. Outra linha de pesquisa é a indução de múltiplas ovulações com baixa dose de Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), realizada por Nagao et al. (2010), que obtiveram o percentual de 85% das éguas que responderam ao tratamento com pelo menos duas ovulações por ciclo. Bem como os resultados de Azevedo et al. (2015) com 86,6% de dupla ovulação.

A ultrassonografia (US) colorida Doppler na reprodução equina trouxe a possibilidade de se reavaliar conceitos antes considerados definitivos no que diz respeito à fisiologia da reprodução. Essa técnica demonstrou-se efetiva e prática para a avaliação não invasiva e em tempo real da perfusão vascular do trato reprodutivo de equinos (GINTHER, 2007).

A primeira descrição do efeito Doppler foi em 1842, pelo pesquisador austríaco Johann Christian Doppler, que a relatou como a alteração na frequência de uma onda sonora emitida ou refletida por um objeto que se encontra em movimento em relação ao observador (CERRI, 1998). 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).

A US Doppler apresenta dois modos de ação distintos: modo-Doppler e modo-Espectral. O modo-Doppler é subdividido em duas funções color e Power-flow, sendo possível estimar a perfusão sanguínea tecidual, observando a percentagem de tecido com pixels coloridos durante o exame. O modo-espectral é quantitativo, fornecendo valores exatos de índices Doppler vasculares e teciduais (GINTHER e MATTHEW, 2004). A adequada mensuração das velocidades de fluxo sanguíneo durante o exame espectral é dependente da correta angulação (ângulo Doppler) entre o transdutor e o vaso sanguíneo avaliado (GINTHER, 2007).

Devido à grande tortuosidade das artérias presentes no mesométrio, ovários e útero, não é possível determinar os seus respectivos ângulos Doppler. Entretanto, como os índices de resistência (RI) e pulsatilidade (PI) não sofrem influência dessa angulação, eles são indicados para a avaliação espectral do trato reprodutivo de éguas (SILVA et al., 2005; FERREIRA et al., 2010). RI e PI apresentam correlação negativa com a perfusão vascular do tecido irrigado pela artéria em questão, ou seja, quanto menores RI e PI maior será a perfusão vascular no tecido suprido por aquele vaso (GINTHER, 2007).

Máquinas de ultrassonografia de alta resolução com modo B (escala de cinza) e modos Doppler trouxeram uma dimensão poderosa para a avaliação do folículo pré-ovulatório nos últimos anos. Estas tecnologias permitiram o desenvolvimento de estudos em maior profundidade científica e clínica no que diz respeito às características do folículo pré-ovulatório e o processo de ovulação. Resultados de estudos recentes têm demonstrado o potencial para fornecer informações clínicas sobre o status e o sucesso futuro de um folículo de ovular e seu óvulo para ser fertilizado e gerar um embrião / gravidez (GASTAL e GASTAL, 2011).

Durante os últimos anos a égua tornou-se um modelo cada vez mais produtivo a pesquisa na área da foliculogênese (GASTAL 2009, 2011). As semelhanças entre éguas e mulheres na dinâmica folicular e alterações hormonais durante o intervalo pré-ovulatório e da onda folicular ovulatória (GINTHER et al., 2004a,c; GINTHER, 2005;), em mudanças ultrassonográficas do folículo pré-ovulatório antes da ovulação (PIERSON e CHIZEN, 1994; GASTAL et al., 1998, 2006a,b), e em processos de envelhecimento reprodutivos (GINTHER et al., 2008, 2009) fornecem justificativa para o uso e destaca a importância da égua como um modelo experimental para o estudo da foliculogênese em mulheres. O modelo de equinos permite o teste de hipóteses utilizando tecnologias não invasivas e pode fornecer informações adicionais que também pode ser considerado útil para outras espécies de animais de fazenda e na medicina clínica humana (GASTAL e GASTAL, 2011).

Diante do exposto a superovulação em equinos possibilita uma maior recuperação embrionária, aumentando o potencial produtivo da fêmea equina. Associando esse conhecimento ao da US Doppler é possível rever e validar vários conceitos da fisiologia básica potencializando os resultados de recuperação embrionária e prenhez em um programa comercial de TE.

2. OBJETIVOS:

- ✓ Avaliar o momento ideal para o início do tratamento superovulatório com baixa dose de deslorelina;
- ✓ Avaliar a viabilidade folicular, após tratamento superovulatório, através do acompanhamento ultrassonográfico Doppler dos folículos subordinado e dominante;
- ✓ Avaliar a ovulação do segundo folículo determinando sua viabilidade em produzir oócitos;
- ✓ Observar se um maior aporte sanguíneo no corpo lúteo (CL) interfere positivamente, na produção de progesterona, na qualidade do CL e na taxa de prenhez de éguas receptoras de embrião.

3. REVISÃO DE LITERATURA:

3.1-Histórico da transferência de embriões:

A primeira transferência de embriões (TE) em animais ocorreu em 1890, na Universidade de Cambridge – Inglaterra, onde Walter Heape realizou o procedimento em animais de laboratório (coelha), com insucesso. Na espécie bovina, o primeiro relato foi descrito por Willett et al. (1951) na Universidade de Wiscosin (EUA), resultando no nascimento do primeiro bezerro fruto da biotecnologia. Em 1960, o mesmo grupo de pesquisadores relatou a importância da sincronização do estro entre doadoras e receptoras (GONSALVES et al., 2002).

O primeiro relato de TE na espécie bovina no Brasil foi realizado Hahn (1977), na Universidade Federal de Santa Maria – RS, viabilizando a técnica aos meados dos anos 80 para todo o país (GONSALVES et al., 2002). Na espécie equina, os estudos envolvendo a TE foram realizados em 1969 por um grupo de pesquisadores japoneses. O mesmo grupo de pesquisadores relatou mais tarde (1972) uma taxa de 45% de sucesso nas colheitas dos embriões, porém nenhuma concepção foi confirmada (OGURI e TSUTSUMI, 1972).

Dois anos depois, os mesmos pesquisadores seguindo a mesma linha de estudo, coletaram 18 embriões em 20 éguas, transferindo 15 destes pelo método não cirúrgico transcervical, para éguas receptoras em sincronismo de -5 a +7 dias, em relação às doadoras, obtendo um percentual de concepção de 40% dos embriões transferidos (OGURI e TSUTSUMI, 1972).

Em 1972, na Inglaterra, foi relatado o nascimento do primeiro potro nascido de um programa de TE através da técnica cirúrgica (ANDRADE, 1986). No Brasil, a TE na espécie equina teve seus primeiros relatos com Fleury et al., (1987), pelo método cirúrgico e por Meira e Henry (1991) pelo método não cirúrgico.

O método mais utilizado atualmente é o transcervical, sendo a colheita de embrião realizada entre o 7º ou 8º dia pós ovulação. Mesmo com o aumento considerável da utilização da TE em todo o mundo, são muitas as limitações para o uso desta biotécnica, tais como: custo elevado, restrição de seu uso em algumas raças, dificuldade na utilização da superovulação em quantidade limitada de embriões por ciclo e as perdas embrionárias das receptoras (TAVEIROS, 2008).

3.2 - Dinâmica Folicular e Ciclo estral das éguas:

As éguas apresentam ciclicidade durante a fase de maior luminosidade do ano, sendo classificadas como monovulatórias poliéstricas estacionais. Elas atingem a maturidade sexual (puberdade) por volta dos dois anos de idade, podendo esta ser alterada pela influência das condições corporais, peso, níveis de energia, ferormônios, raça e a estação do ano (GINTHER e BERGFELT, 1993).

O ciclo reprodutivo da égua é o mais vulnerável às variações climáticas entre as espécies domésticas (GINTHER e BERGFELT, 1993). A espécie depende da exposição diária à luminosidade, condição que justifica sua atividade reprodutiva durante todo o ano a baixa latitude, onde não há grandes variações de luminosidade (GINTHER e BERGFELT, 1993).

Éguas mantidas sob dias longos (16h de luz/dia) apresentam atividade ovariana cíclica, enquanto que éguas mantidas em dias curtos (8,5h) apresentam ovário sem ciclicidade. Esta variável ocorre em função de dias curtos, quando se associa ao decréscimo na secreção de gonadotrofinas hipofisárias acarretando uma redução da atividade ovariana (NAGY et al., 2000).

Segundo Taveiros (2008), éguas quando mantidas em climas de alta luminosidade, continuam cíclicas, o que pôde ser observado em éguas no Rio de Janeiro nos meses de novembro a abril e em Pernambuco nos meses de maio a outubro, possibilitando a coleta de embriões durante todo o ano, no entanto, observou-se que a elevação do índice pluviométrico, leva a uma diminuição da atividade reprodutiva de algumas éguas, ocasionando uma queda na produção de embriões e prenhez.

O ciclo estral na espécie equina é uma combinação de eventos fisiológicos que ocorrem entre duas fases, estro e diestro (ANDRADE, 1986), podendo-se também denominá-las de fase folicular e fase luteal (DIELEMAN et al., 1986), que são intervaladas entre dois períodos sucessivos de cio (ANDRADE, 1986). A definição de ciclo estral de éguas mais próxima da ideal é a do período entre duas ovulações, no qual existe uma fase onde a égua apresenta evidentes sinais de estro, ou quando esses sinais não são aparentes, onde há uma baixa concentração de progesterona, inferior a 1 ng/mL (HUGHES et al., 1986).

O ciclo estral em éguas apresenta uma duração média de $21,7 \pm 3,5$ dias. A fase folicular ou de estro apresenta uma duração média de $6,5 \pm 2,6$ dias e a fase luteal ou de diestro $14,9 \pm 2,8$ dias durante a estação fisiológica de monta. A duração da fase folicular é primariamente influenciada pela estação do ano, podendo também sofrer variações individuais ou raciais. A duração do estro decresce com o avanço da estação, coincidindo com o auge do verão, época nas quais os dias são mais longos, o fotoperíodo é maior e a foliculogênese é acelerada. A duração média do estro para observações individuais varia de 2 a 12 dias e parece, imparcialmente, ter repetibilidade em cada indivíduo (GINTHER, 1992).

A fase de estro ou fase folicular, em éguas, é caracterizada pela presença de um folículo com mais de 25 mm de diâmetro no ovário, onde são produzidos elevados níveis de estrógenos pelas células da granulosa (GINTHER, 1992).

As quantidades crescentes de estradiol secretadas pelos folículos ovarianos induzem não só ao comportamento de estro como também a elevação dos níveis de Hormônio Luteinizante (LH), e

ativação dos receptores para LH nas células da granulosa, e conseqüentemente a ovulação e a formação do corpo lúteo (CL) (GINTHER, 1992).

A elevação dos níveis de estrógeno durante a fase estral é também responsável pela formação do edema uterino; o qual tende a ser diminuído nos dois dias que antecedem a ovulação (GINTHER e BERGFELT, 1993). Já a fase de diestro ou luteal é caracterizada pelo término das manifestações dos sinais do cio, que ocorrem entre 24h e 48h após a ovulação, resultando na formação do CL e conseqüente produção de progesterona (HAYES e GINTHER, 1986). Sirois et al. (1989) consideram a ovulação como o início da fase luteal, e a fase final culminando com a luteólise, apresentando níveis plasmáticos de progesterona inferiores a 1ng/mL.

Na fase luteal, o CL produz progesterona em quantidades crescentes do segundo ao décimo dia pós-ovulação. Esta secreção se mantém estável até o décimo segundo dia, quando ocorre uma redução acentuada nas concentrações plasmáticas de progesterona, em consequência da luteólise que ocorre entre o décimo quarto e o décimo sexto dia do ciclo estral (GINTHER, 1992). A luteólise é desencadeada pelo início da produção de estrógeno pelo folículo dominante que por sua vez aumenta os receptores de ocitocina no endométrio, sendo a ocitocina o gatilho para a síntese de prostaglandina endometrial. O folículo dominante próximo a luteólise também secreta inibina que inibe a produção de Hormônio Folículo Estimulante (FSH), levando a atresia dos folículos subordinados (GINTHER, 1992).

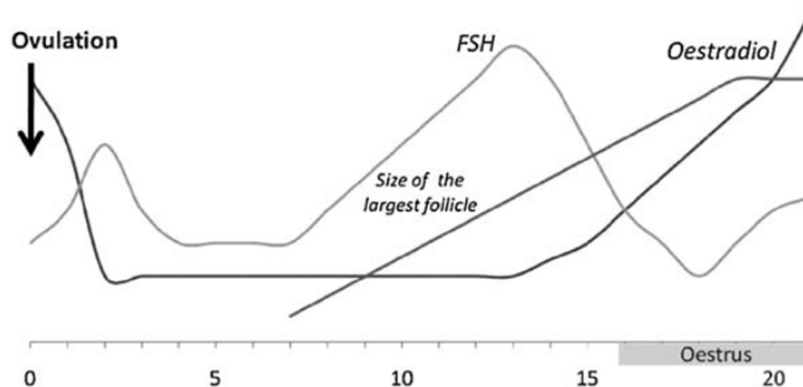


Figura 1: Níveis de FSH e Estradiol no ciclo estral. Fonte: AURICH (2011).

Alterações fisiológicas podem ser observadas à palpação uterina, via toque retal, sendo usada clinicamente e experimentalmente como uma forma para determinar o estágio do ciclo estral nas éguas (HAYES e GINTHER, 1986).

Durante o estro o tônus uterino é relativamente flácido, tornando-se mais tenso durante o diestro, por volta do 16° ao 25° dia de gestação, quando o útero apresenta sua tensão máxima. No

início da gestação o tônus uterino é de suma importância para a fixação e orientação da vesícula embrionária (HAYES e GINTHER, 1986).

Bonafos et al. (1994) afirmaram que a progesterona é o único fator capaz de promover um aumento do tônus uterino. A partir do 30° dia de gestação o tônus uterino não apresenta diferença entre éguas não prenhas, tratadas desde o dia da ovulação com 100 mg de progesterona e éguas prenhas. No entanto, entre os dias 11° e 29° de gestação as éguas prenhas apresentam um maior tônus devido a uma estimulação local realizada pelo concepto durante o período de mobilidade. Porém, Hayes e Ginther (1986), utilizando éguas ovariectomizadas, constataram que a progesterona é capaz de causar tônus equivalente ao observado no diestro, mas o tônus máximo, semelhante ao tônus encontrado por volta do 16° ao 25° dias pós-ovulação, só é detectado quando a progesterona esta associada ao estrógeno.

Samper (1997) afirmou que o edema uterino é um indicador confiável da competência estrogênica do folículo dominante, mas Watson et al. (2003) demonstraram que o edema uterino pode ocorrer na presença de folículos anovulatórios, até mesmo quando estes folículos produziram baixas concentrações de estradiol.

Com o uso da ultrassonografia na reprodução equina na década de 80, uma maior precisão da atividade ovariana, no que diz respeito ao recrutamento, crescimento, divergência e atresia folicular, pôde ser estudada, tendo sido correlacionada a dinâmica folicular aos mecanismos reguladores hormonais (MAPLETOFT et al., 1994; FORTUNE, 1994).

Em equinos, semelhante aos bovinos e ovinos, durante a fase luteal ocorre o desenvolvimento de ondas de crescimento folicular, diferente do que ocorre em ratos, suínos e primatas, onde o crescimento folicular fica restrito a fase folicular (FORTUNE, 1994).

Com a formação do antro folicular, os folículos tornam-se dependentes de gonadotrofinas para novo desenvolvimento, o qual é evidente pela expressão de receptores de FSH nas células da granulosa e de receptores de LH nas células da teca interna, ocorrendo o crescimento de vários folículos em sincronia, estabelecendo-se uma onda de crescimento folicular (WEBB et al., 1999).

Segundo Ginther (1992) a definição de onda folicular maior se aplica a um conjunto de folículos que inicialmente exibem crescimento sincronizado, sucedidos pelo crescimento preferencial de apenas um, ocasionalmente dois folículos. A onda folicular maior divide-se em onda primária e onda secundária. A onda folicular primária inicia-se na metade do diestro e da origem ao folículo ovulatório (>35mm). A onda secundária emerge no início do estro e usualmente resulta na formação de grandes folículos anovulatórios (>20 mm) ou, mais raramente, em ovulação durante o diestro. As ondas que não apresentam folículos dominantes são classificadas como ondas menores.

A ocorrência de ovulações durante o diestro, observadas em éguas (ovulações secundárias com incidência de 25%) durante uma fase em que as concentrações de LH encontram-se baixas,

com a presença de alta progesterona, sugere que o aumento pré-ovulatório de LH não é um pré-requisito absoluto para o processo de ovulação nesta espécie. Como consequência, essas ovulações secundárias podem levar a uma condição de persistência luteal, já que no momento em que o endométrio está secretando prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), este CL secundário estaria refratário a ação luteolítica do mesmo (DAELS e HUGHES, 1993).

Estudos comparativos da dinâmica folicular entre raças têm indicado maior predisposição a duas ondas foliculares para as raças puro sangue inglês (PSI), Apallosa e Quarto de Milha (GINTHER e BERGFELD, 1993), quando comparadas com as raças Árabe e Pônei (GINTHER, 1992; DIMMICK et al., 1993) na primeira metade da estação reprodutiva.

Meira e Buratini (1998) realizaram um estudo visando à caracterização do desenvolvimento folicular em éguas Mangalarga. Os folículos maiores que 10 mm de diâmetro, no dia 17 do ciclo estral, foram diariamente monitorados individualmente por ultrassonografia. Uma ou duas ondas foliculares foram detectadas, respectivamente, em 81,25% (13/16) e 18,75% (3/16) dos ciclos.

A ovulação na espécie equina ocorre quando o folículo atinge por volta de 35 a 60 mm, com média em torno de 45 mm (SHIRAZI et al., 2004). O crescimento diário dos folículos recrutados durante as ondas foliculares pode variar de 2,5 a 3,0mm (GINTHER, 1986). Porém, quando se beneficiam da estimulação ovariana através de preparados hormonais, o crescimento folicular diário pode alcançar 3,0 mm ou mais (MOURA e MERKT, 1996).

A atividade ovariana também tem sido estudada entre éguas jovens, adultas e idosas, apresentando uma maior queda desta atividade a partir dos quinze anos de idade, onde se observa um atraso na emergência das ondas foliculares, no prolongamento do intervalo interovulatório e redução da população de folículos nas ondas foliculares (GINTHER e BERGFELT, 1993; CARNEVALE e GINTHER, 1995).

Mckinnon et al. (1988), estudando folículos pré-ovulatórios observaram que a ovulação ocorre num período de 5 a 90 segundos, quando pouco ou nenhum líquido folicular fica interno ao folículo após a ovulação.

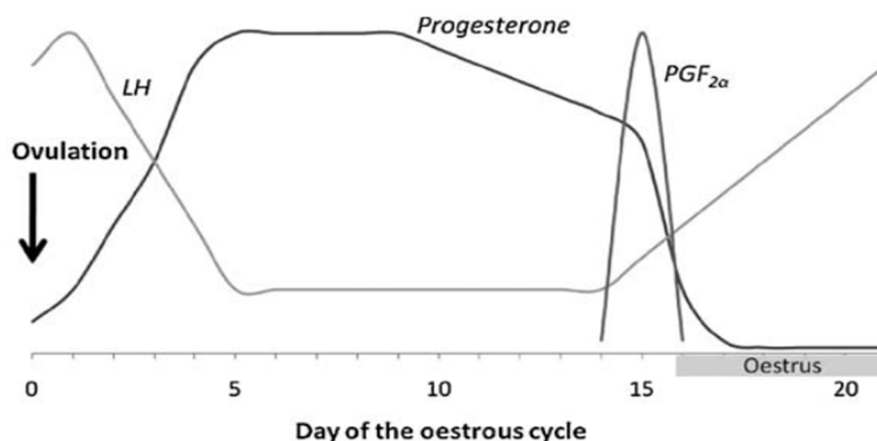


Figura 2: Níveis de LH, Progesterona e $PGF_{2\alpha}$ no ciclo estral. Fonte: AURICH (2011).

Na égua, a secreção do LH não ocorre de maneira abrupta como nos outros mamíferos, mas sim de maneira crescente e essa produção se inicia 6 a 8 dias antes da ovulação. A produção mais alta de LH irá ocorrer aproximadamente entre o 1° e 3° dia pós-ovulação. No final da maturação do oócito a ruptura do folículo e a evacuação do fluido folicular têm que ser bastante coordenada para que ocorra um sucesso na ovulação (PIERSON, 1993). Greaves et al. (2001) sugeriram que a queda na liberação de LH pós-ovulação ocorre devido a um "feedback" negativo entre a progesterona e o GnRH. A progesterona age na hipófise, alterando a responsividade ao GnRH e com isso promove redução da secreção de LH, sendo o GnRH é o regulador mais expressivo da secreção tanto de LH quanto de FSH em éguas em diestro.

3.3 - Frequência de ovulações múltiplas na égua:

Ovulações múltiplas (predominantemente ovulações duplas) podem ocorrer normalmente em éguas, sendo esta característica uma variação individual, tendo sua incidência relacionada à vários fatores como, raça, predisposição genética, estágio reprodutivo, estação do ano e nutrição, podendo variar de 4 a 43%, à depender dos fatores anteriormente citados (GINTHER, 1992).

Zúccari et al. (2002) ao acompanharem o ciclo estral de 122 éguas da raça pantaneira entre os anos 1995 e 2000, não observaram nenhuma ovulação múltipla, já Pimentel et al. (1995) identificaram 7,1% de ovulações múltiplas entre as 3361 éguas, predominantemente da raça Criolo Gaúcho, abatidas em Pelotas – RS entre 1988 e 1989, das quais 6,5% de dupla, 0,5% de tripla e 0,1% de quádrupla, na raça puro-sangue, já em cavalos de tração a incidência de ovulações múltiplas, variou entre 15 e 30%, enquanto que em pôneis apresentou-se menor (2-10%).

Carmo et al. (2003), estudaram a incidência de ovulações duplas em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de TE. De um total de 829 ciclos estrais analisados, 47% foram de ovulações simples e 53% de ovulações múltiplas (duplas ou triplas), obtendo uma taxa de recuperação embrionária de 59% nos ciclos de ovulação simples e 88% nos ciclos de ovulações múltiplas.

Squires et al. (1987) estudaram as características reprodutivas de éguas que apresentaram ovulações simples ou duplas espontâneas. A recuperação embrionária no sétimo dia pós-ovulação foi de 58,2% para éguas com ovulação simples e de 106% para éguas com ovulação dupla espontânea, demonstrando que a dupla ovulação apresenta aumentou a taxa de recuperação embrionária.

3.4 – Superovulação:

Economicamente, há uma necessidade de aumentar a taxa de sucesso da TE e isto é possível com a indução de ovulações duplas ou de superovulação, da égua doadora, aumentando a taxa de

recuperação embrionária por lavado uterino. Não esquecendo, no entanto, que esta melhoria continua a depender do manejo reprodutivo preciso e sincronização das éguas doadoras com as receptoras (RAZ et al., 2006).

O tratamento superovulatório aumenta significativamente a eficiência e diminui potencialmente o custo de um programa de TE. No entanto, a indução de ovulações múltiplas na espécie equina não é um procedimento tão eficaz quando comparado a outras espécies domésticas. De acordo com Scherzer et al. (2008) a superovulação em éguas se encontra com sucesso limitado atualmente, na qual as taxas de recuperação embrionária são inconsistentes e abaixo das expectativas (ALVARENGA et al., 2001; NISWENDER et al., 2003).

De fato, a anatomia do ovário e a ausência de um produto que induza ovulações múltiplas de forma precisa, são as duas principais razões para que a superovulação não seja uma técnica comumente utilizada na reprodução de equinos (SQUIRES, 2006).

Vários hormônios têm sido estudados a fim de melhorar os índices de coleta de embriões, tais como: Hormônios Liberador de Gonodotrofinas (Gnrh), Hormônio Folículo Estimulante (FSH) suíno (FSH-p) e equino (FSH-e), gonadotrofina coriônica equina (ECG), imunização contra inibina, extrato de pituitária eqüino (EPE) (NISWENDER et al., 2003; SQUIRES e MCCUE 2007). Dentre estes, o FSH-e e o EPE são os que apresentam resultados mais consistentes. Contudo, a baixa taxa de recuperação embrionária ainda é o maior entrave na superovulação em éguas (BONIN e ALVARENGA., 2009).

A partir de 2003, um purificado FSH-e (Bioniche Animal Health Canadá) tornou-se disponível comercialmente, conseqüentemente poucos e recentes experimentos foram conduzidos usando este produto na superovulação em éguas. Além disso, este produto não é encontrado no mercado brasileiro, sendo então de custo elevado para aquisição, o que torna incomum seu uso a campo (ALVARENGA et al., 2008).

Os protocolos usualmente utilizados são baseados na administração de 12 mg de FSH-e duas vezes ao dia, resultando em taxas de 3,4 a 5,2 ovulações por égua (NISWENDER et al., 2003).

De 170 éguas tratadas com EPE, foi obtida uma média de 3,2 ovulações e foram recuperados 1,96 embriões por égua, contrastando com o grupo não tratado que recuperou apenas 0,65 embrião por égua (SQUIRES e MCCUE, 2007). Alvarenga et al. (2001) utilizando 25 mg de EPE, duas vezes ao dia, demonstraram uma melhora no percentual de ovulações, apresentando uma média de 4 a 7 ovulações por égua, porém com baixa taxa de recuperação embrionária.

Carmo et al. (2005) e Carmo (2007) avaliaram oitutos quanto à presença e quantidade de oócitos obtidos em éguas superovuladas com EPE, 25 mg, duas vezes ao dia, a partir do dia 7 pós-ovulação e um grupo controle. Constataram a superioridade do número de ovulações das éguas superovuladas ($4,41 \pm 2,90$) ao grupo controle ($1,16 \pm 0,40$), e obtiveram uma taxa de recuperação

de oócito/ovulação próximo de 60% no grupo superovulado contra 85% de recuperação no grupo controle, demonstrando que ocorre algum problema na captação dos oócitos para o oviduto em éguas superovuladas, sendo percebido apenas a formação de um grande coágulo que poderia impossibilitar a captação dos oócitos pelas fimbrias. Contudo, no grupo de éguas superovuladas, as que responderam com menos de 3 ovulações apresentaram taxa de recuperação de oócito no oviduto similar à obtida no grupo controle (80%).

Em busca de desenvolver uma terapia que permita uma maior taxa de embriões recuperados por ovulação tem sido proposto baixas doses de EPE (6 mg) ou de FSH-e (5mg), ambos com uma única dose ao dia, demonstrando eficácia de tal procedimento (FARINASSO, 2004; ARAUJO et al., 2009).

Farinasso (2004) é foi pioneiro na indução de múltiplas ovulações utilizando baixa dose de EPE. Utilizando éguas no diestro (6 a 9 dias), as éguas foram induzidas ao cio com $PGF_{2\alpha}$ e submetidas ao tratamento diário com baixa dose de EPE, por via intramuscular, até o momento em que um ou mais folículos atingissem 35 mm de diâmetro. Foram testados três doses de EPE 2, 4 e 6mg. Apenas as doses de 4 e 6 mg, duas vezes ao dia, elevaram a taxa de ovulação em relação ao grupo controle e promoveram aumento significativo de ovulações duplas e triplas em 76,9% dos ciclos tratados. Para o tratamento com 6 mg foi obtida a média de $1,84 \pm 0,75$ embriões/ciclo. Desta forma, o protocolo garantiu um embrião/lavado, o que pode tornar o uso de EPE economicamente viável.

A observação que a taxa de recuperação embrionária por ovulação é mais alta em éguas com 3 ou menos ovulações indica que a utilização de baixa dose de EPE ou de FSH-e, aponta ter uma resposta ovariana menor, o que parece ser o melhor modo para progredir o número de embriões produzidos em programas de TE (ALVARENGA et al., 2008). Para Araújo et al. (2009) realizando-se um leve ajuste na dose e na frequência de administração do FSH-e, juntamente com a seleção de animais, baseando-se na população folicular, será constantemente possível induzir ovulações duplas e triplas, com recuperação de embrião satisfatória, a um custo inferior aos protocolos superovulatórios convencionais.

O tratamento com GnRh vinha sendo descrito como capaz de induzir ovulação em éguas em anestro, fora da época reprodutiva (GINTHER e BERGFELT, 1993). No entanto, quando em estação de monta, este hormônio não apresentava relatos de eficácia na indução de ovulações múltiplas (HARRISON et al., 1990; HARRISON et al., 1991). Porém, resultados recentes de Nagao et al. (2010), revolucionam as perspectivas quanto ao uso deste hormônio, ao relatarem a indução de ovulação dupla, utilizando, baixa dose de GnRH, obtendo um percentual de 85%, de éguas com pelo menos duas ovulações por ciclo, com um número de ovulações por ciclo (26/48) e a porcentagem de embriões recuperados por ciclo (55% / 90%), para controle e tratados, respectivamente.

te, o que é confirmado por Azevedo et al. (2015), que obteve um percentual de éguas com ovulações múltiplas 86,66% no grupo tratado, com uma média de recuperação embrionária $1,066 \pm 0,497$; um percentual de recuperação embrionária por lavado de 80% no grupo tratado.

3.5- Ultrassonografia Doppler:

3.5.1- Histórico e fundamentos da técnica Doppler

Em 1842, Christian Johann Doppler descreve a situação na qual uma fonte de ondas (sonoras ou eletromagnéticas), que está em movimento em relação a um receptor, altera a frequência de onda durante este processo, aumentando a frequência durante a aproximação da fonte e diminuindo durante o seu distanciamento. Assim, na ultrassonografia, o chamado efeito Doppler pode ser definido como sendo o princípio físico no qual se verifica a alteração da frequência das ondas sonoras refletidas quando o objeto (corpo) refletor se move em relação a uma fonte de onda sonora (KAWAKAMA et al., 1993).

Quando se trata de um som audível, o efeito Doppler é um fenômeno natural observado em nosso cotidiano, como por exemplo, o som da buzina de um carro movimentando-se em relação a uma pessoa parada. O efeito Doppler é baseado na frequência Doppler, que é a diferença entre a frequência de ecos recebidos e ecos emitidos pelo transdutor sendo o referencial estático o transdutor, e a hemácia o objeto em movimento, que irá gerar a diferença entre a frequência de ecos emitidos e recebidos (GINTHER e UTT, 2004).

A diferença entre a frequência do som transmitido (f_t) e a daquele refletido (f_r) é chamada deslocamento de frequência Doppler (f_d) (SZATMARI et al., 2001). Se o sentido do fluxo sanguíneo f_r na direção do transdutor, então a f_d será positiva, isto é, o eco retornado terá uma frequência mais alta. Se a direção do fluxo sanguíneo for ao sentido contrário ao do transdutor, então a f_d será negativa (isto é, a frequência do ultrassom refletido é mais baixa do que aquela transmitida). Assim, a velocidade de aproximação do objeto será a componente vetorial do movimento paralela ao feixe sonoro, proporcional ao co-seno do ângulo de aproximação (CERRI, 1998).

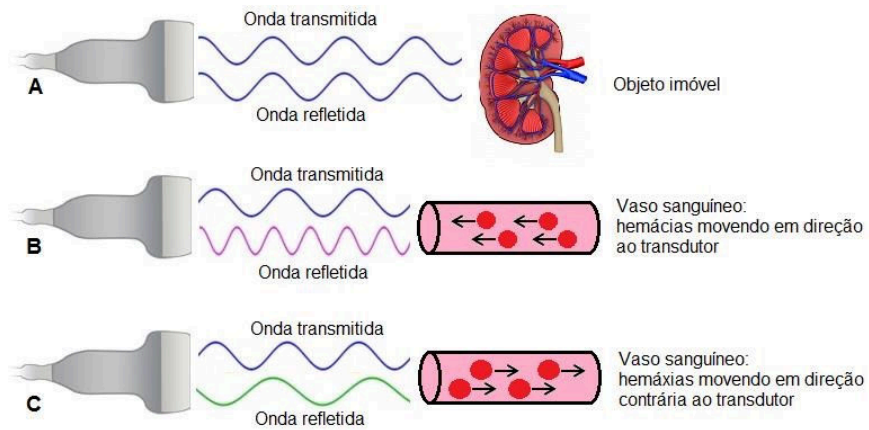


Figura 3: Esquema da variação das ondas sonoras transmitidas e emitidas pelo transdutor em: A – objeto imóvel – reflete a onda com a mesma frequência que foi emitida, B – objeto com movimentação em direção ao transdutor – reflete a onda com frequência maior que a emitida, C – objeto com movimentação em direção contrária ao transdutor – reflete a onda com frequência menor do que a emitida. Fonte: CARVALHO (2009).

Esta técnica apresenta diferentes modos de ação, que podem ser escolhidos de acordo com a área alvo de interesse: o modo Doppler - espectral e o modo Doppler - colorido. O modo Doppler - espectral é utilizado para avaliação das velocidades, da pulsatilidade e resistência do fluxo sanguíneo, de uma artéria específica. Nesta análise é necessário posicionar o cursor inteiramente sobre o lúmen do vaso sanguíneo, para a mensuração das velocidades e produção de um gráfico espectral. As alterações de frequência e amplitude do fluxo sanguíneo são exibidas em forma de ondas, e cada onda representa um ciclo cardíaco CARVALHO (2009).

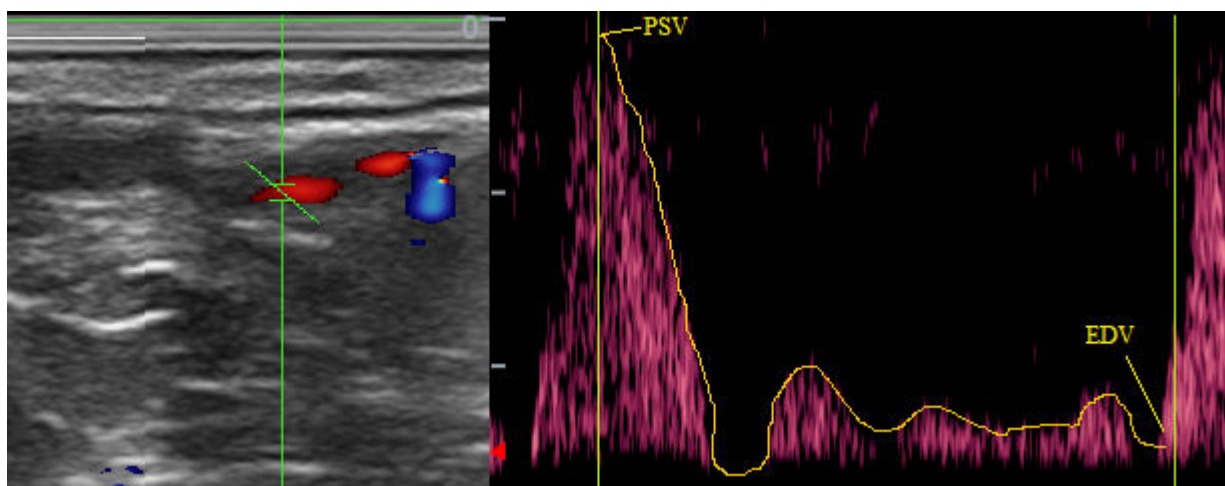


Figura 4: Imagem ultrassonográfica Doppler - modo espectral, de uma artéria localizada no mesométrio uterino. O cursor Doppler (Verde) está posicionado sobre o lúmen do vaso sanguíneo para obtenção de um gráfico espectral. A velocidade do pico sistólico (PSV) e velocidade diastólica final (EDV) representam a velocidade máxima e velocidade final de um ciclo cardíaco, respectivamente. Fonte: (Arquivo pessoal).

O ponto mais elevado no traçado do gráfico gerado no modo espectral- Doppler representa a velocidade máxima do fluxo sanguíneo no pico sistólico (PSV), enquanto o ponto mais baixo, anterior ao início do próximo ciclo cardíaco, representa a velocidade do fluxo sanguíneo no pico diastólico final (EDV). A velocidade máxima média (TAMV) é gerada pelo cálculo da média de todas as velocidades máximas dividida pelo tempo de duração do ciclo (GINTHER, 2007).

A angulação entre a intersecção dos ecos emitidos pelo transdutor com o movimento das células sanguíneas é denominada ângulo Doppler ou ângulo de insonação. Este ângulo deve estar entre 30 e 60 graus para produzir um gráfico espectral com valores das velocidades do fluxo sanguíneo confiáveis, durante o exame Doppler - espectral (GINTHER e UTT, 2004). Entretanto, a determinação do ângulo Doppler em vasos uterinos e ovarianos de pequeno calibre é difícil por apresentarem grande tortuosidade (SILVA et al., 2006).

Os índices Doppler são uma alternativa para minimizar os erros de mensuração das velocidades do fluxo sanguíneo, por não dependerem do ângulo de insonação (GINTHER, 2004). Os índices de resistência (RI) e pulsatilidade (PI) são gerados pelas equações $[(PSV-EDV) / PSV]$ e $[(PSV- EDV) / TAMV]$, respectivamente, e são especialmente úteis em mensurações de fluxo sanguíneo de vasos de pequeno calibre e tortuosos, que não permitem a estimação dos valores reais do fluxo sanguíneo. Estes índices expressam a relação entre a extensão da resistência (RI) e extensão da pulsatilidade (PI), e apresentam uma relação inversamente proporcional com a perfusão vascular (PV) (ACOSTA et al., 2004a; GINTHER, 2004).

O modo Doppler - colorido é utilizado para análise de estruturas ou órgão como um todo, permitindo uma avaliação geral da perfusão sanguínea (SILVA, 2010). A área de fluxo sanguíneo é exibida em pontos coloridos sobrepostos em uma imagem ultrassonográfica em modo-B, em campo total de visão ou em uma área delimitada pelo operador (box). Este modo apresenta duas funções: a Color - Flow e Power - Flow (GINTHER, 2007).

A função Color – Flow representa a Perfusão Vascular (PV) da estrutura em duas cores: azul e vermelha, baseada no sentido do movimento em relação ao transdutor. As hemácias que se afastam ou se aproximam do transdutor são expressas nas cores azul e vermelha, respectivamente. A tonalidade da cor indica a velocidade do fluxo, sendo que tons claros representam maior velocidade do fluxo sanguíneo (GINTHER, 2004).

A função Power - Flow, que devido à maior sensibilidade, permite uma avaliação mais precisa de vasos sanguíneos com menor diâmetro ou baixo fluxo de sangue, que muitas vezes não são perceptíveis na função Color - Flow. As imagens do fluxo sanguíneo são exibidas em escala de uma cor ou mais cores e, a intensidade da cor varia de acordo com a velocidade do fluxo sanguíneo (GINTHER, 2007).

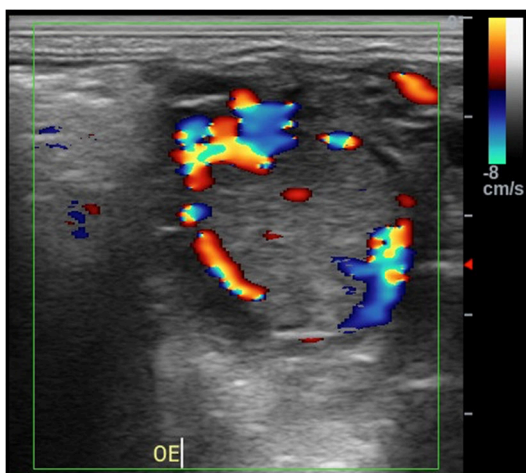


Figura 5: imagem de um Cl, pelo modo Color Flow. Fonte: Arquivo pessoal.

A avaliação da imagem nos modos Color-Flow e Power-Flow pode ser feita de forma objetiva ou subjetiva. Na avaliação objetiva uma imagem com vascularização máxima é escolhida e os pixels coloridos contados por programas de computador, fornecendo uma medida quantitativa da perfusão. Tendo como desvantagem trabalhar com apenas uma imagem e não fazer avaliação em tempo real. Uma vez que a determinação da imagem a ser mensurada é feita pelo avaliador, pode haver influência neste momento, ou a imagem não ser demonstrativa de toda a área do órgão alvo (GINTHER, 2007).

A avaliação subjetiva no qual escores de avaliação são dados para a vascularização, sendo a mínima 1 e a máxima 4. Este método facilita a identificação do perfil e a análise estatística durante um período e entre os grupos experimentais, tendo como desvantagem a subjetividade, porém tendo como grande vantagem em tempo real e de forma prática (GINTHER, 2007; FERREIRA e MEIRA, 2011).

3.6 - Fornecimento de Sangue Genital na égua:

3.6.1 - Artéria Uterina

O útero recebe sangue do ramo uterino da artéria ovariana, uma fonte principal da artéria uterina, e o ramo uterino da artéria vaginal (Figura 6). A artéria uterina origina a partir da artéria ilíaca externa na égua. A aorta continua como um tronco comum de alguns centímetros entre as origens das artérias ilíacas internas e externas. Após o mesométrio a artéria uterina constitui um ramo cranial e caudal (GINTHER, 2007).

3.6.2 - Artéria Ovariana

A artéria ovariana sai da aorta, como mostrado na Figura 6, corre dorsalmente ao longo da parede abdominal, e entra no mesovário. A artéria direita atravessa ao longo da veia cava ventral. A artéria do ovário passa ao longo da face craniana do mesovário. Em éguas artéria ovariana é de

poucos centímetros caudal à veia útero - ovariana relativamente simples de ser localizado. O ramo uterino da artéria ovariana ou anastomose útero - ovariana é altamente variável entre os indivíduos e os lados (GINTHER, 2007). A descrição detalhada do local de artérias uterinas e ovarianas, utilizando ultra-som Doppler são revisados por Ginther (2007).

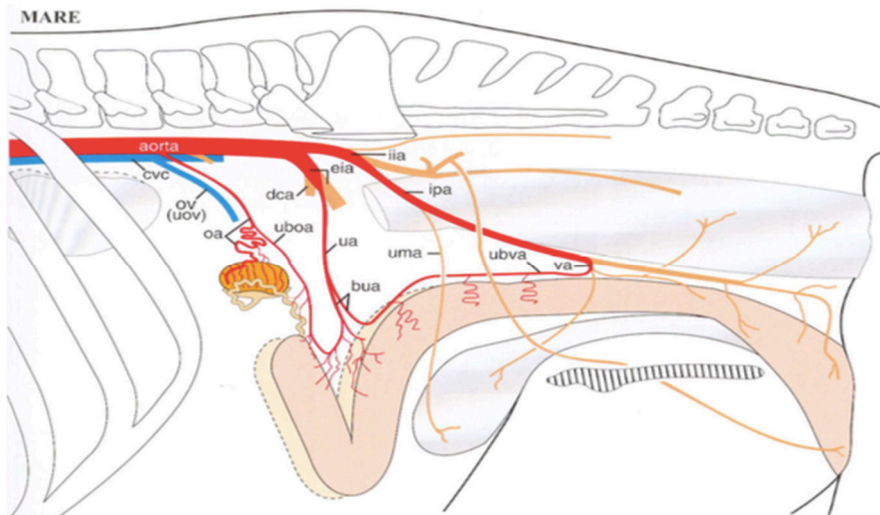


Figura 6: Visão Lateral do suprimento sanguíneo arterial no trato genital da égua. Legenda: cvc V. cava caudal; dca A. circunflexa ílio profunda; eia A. íliaca externa; ia A. íliaca interna; ipa A. pudenda interna; oa A. ovariana; ov V. ovariana; ua A. uterina; uboa R. uterino para A. ovariana; ubva R. uterina para A. vaginal; va A. vaginal. Fonte: (GINTHER 2007).

3.7- Fluxo sanguíneo ovariano durante o ciclo estral na égua:

A caracterização da PV (perfusão vascular) ovariana durante ciclo estral de éguas foi realizada por Bollwein et al. (2002), baseado nos valores de PI, obtidos por meio da avaliação ultrassonográfica Doppler modo-espectral da artéria ovariana. Neste estudo observou-se que durante a fase de diestro, os ovários que possuíam o CL, apresentaram maior fluxo sanguíneo, enquanto no estro não foi observada diferença entre o fluxo sanguíneo entre os ovários.

Entre D0 e D2 os valores de PI da artéria ovariana ipsilateral ao CL apresentam-se altos (BOLLWEIN et al., 2002). Período este correspondente à formação do corpo hemorrágico e a um processo de vascularização ainda incompleto, por meio da análise histopatológica (AL-ZI'ABI et al., 2003). Após este período, ocorre um decréscimo dos valores do PI até D6, representando o aumento na perfusão sanguínea ovariana. A partir de então, os valores de PI aumentam lentamente durante a fase progesterônica intermediária, apresentando valores máximos no D15 (Figura 7; BOLLWEIN et al., 2002).

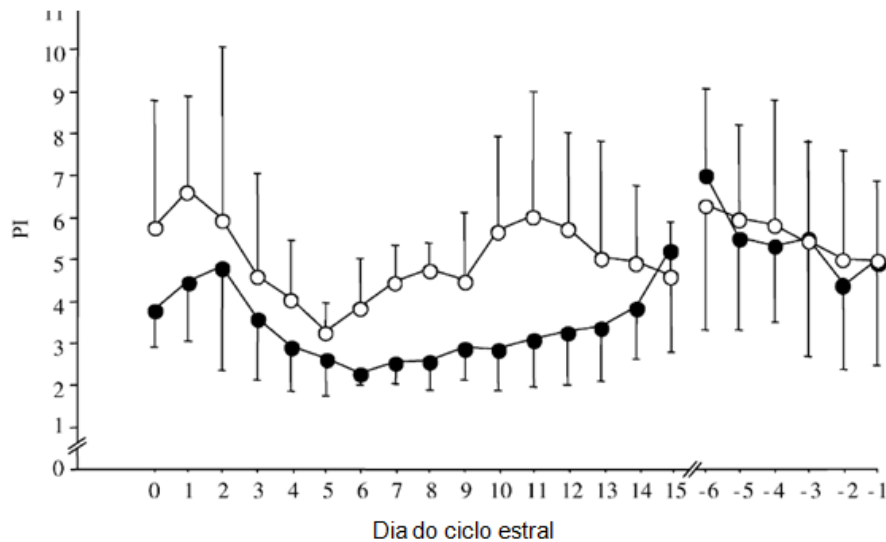


Figura 7: Média (\pm e.p.m), para o PI das artérias ovarianas ipsi (●) e contralateral (○) ao folículo dominante ou CL, durante o ciclo estral de éguas com ovulações espontâneas (D0=dia da ovulação) Fonte: Bollwein et al, (2002).

Inicialmente, as avaliações da hemodinâmica do trato reprodutivo eram realizadas por meio de mensurações da artéria uterina e ovariana (BOLLWEIN et al., 2002; BOLLWEIN et al., 2003). As artérias de grande calibre como a artéria uterina e ovariana permitem um exame mais rápido e fácil, porém, se ramificam e irrigam outros tecidos além do útero e ovário. Além disso, podem ficar relativamente distantes da área de interesse, como por exemplo, de estruturas ovarianas como folículos e CL. Desta maneira, é possível que haja influência de outros fatores nos valores das velocidades do fluxo sanguíneo das artérias de grande calibre, e não apenas alterações relacionadas aos eventos que ocorrem no ovário e útero.

Neste contexto, novas pesquisas tem mostrado um novo método de avaliação do trato reprodutivo. O estudo da PV uterina tem sido realizado diretamente na área alvo de interesse, por meio da avaliação de vasos presentes no miométrio, endométrio e mesométrio (FERREIRA et al., 2010). A mesma metodologia tem sido utilizada para estudo de estruturas ovarianas, como folículos e CL, por meio da avaliação de vasos presentes na parede folicular (GASTAL et al., 2006a; SILVA et al., 2006) ou no tecido luteal (GINTHER et al., 2007).

3.8 - Avaliação do ciclo estral por ultrassonografia Doppler:

3.8.1- Detecção do início do ciclo estral:

A detecção precoce do início da atividade cíclica é uma ferramenta valiosa no manejo reprodutivo de equinos, pois possibilita uma maior produção de embriões ao longo da estação de monta e evita a realização de coberturas e tratamentos indutores de ovulação desnecessários. Através da US Doppler, é possível determinar o potencial ovulatório de folículos dominantes durante o período de transição de primavera (ACOSTA et al., 2004a).

O período de transição é caracterizado pela presença de ondas foliculares menores e/ou ondas maiores anovulatórias. Acosta et al. (2004a) demonstraram que o diâmetro máximo e a taxa de crescimento folicular não são bons indicadores do status ovulatório de folículos durante o período de transição, ao contrário da vascularidade da parede folicular. Folículos dominantes ovulatórios apresentam um aumento progressivo da vascularização a partir da divergência folicular, enquanto que folículos anovulatórios apresentam baixa vascularização independente de seu diâmetro.

Acredita-se que esta vascularização diminuída de folículos maiores anovulatórios esteja relacionada com a baixa concentração sérica de LH durante o período de transição. Esta deficiência de LH resultaria na baixa concentração de fatores intra - foliculares, como estradiol, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e inibina (GINTHER et al., 2003). As baixas concentrações de estradiol e inibina resultam no aumento na concentração sérica de FSH e contínuo crescimento folicular, enquanto que a baixa concentração de VEGF ocasiona distúrbios na angiogênese das células da parede folicular (GINTHER, 2007).

No que diz respeito ao fluxo de sangue do folículo pré-ovulatório, estudos recentes têm mostrado um aumento diário na vascularização da parede do folículo dominante enquanto amadurece e se aproxima o dia da ovulação (GASTAL et al., 2006a, 2007a; PALMER et al., 2006; GINTHER et al., 2009).

Área de fluxo sanguíneo já era menor em folículos anovulatórios dominantes do que para folículos ovulatórios estas determinações de fluxo de sangue começaram antes dos 25 mm (GINTHER et al., 2004b). A este respeito, as alterações vasculares pré-ovulatórias foram comparadas entre as primeiras e posteriores ovulações do ano em 40 éguas pônei durante 6 dias antes da ovulação. Embora a área de fluxo de sangue aumentado para o folículo no dia da ovulação em ambos os grupos, os resultados demonstraram que a vascularização do folículo e do surgimento de LH foram atenuadas no que precede a primeira ovulação do ano, sem qualquer indicação de que o estradiol esteja envolvido nas diferenças entre as primeiras e posteriores ovulações (GASTAL et al., 2007a).

Nos mamíferos, um folículo pré-ovulatório é constituído por um antro cheio de líquido encapsulado progressivamente (de dentro para fora) por granulosa, teca interna, e camadas da teca externa (HUNTER, 2003). O extrato granuloso avascular é separado a partir das camadas vasculares da teca por uma membrana basal. A teca interna é uma camada de células glandulares que se misturam com um rico plexo capilar. A teca externa é mais fibrosa, mas contém uma rede importante de arteríolas e vênulas. À medida que o folículo amadurece, a expansão dos vasos e capilares da teca envolve a formação de novos vasos, bem como a dilatação dos vasos existentes (FAMILIARI et al., 1991).

Estudo realizado em éguas cíclicas, ou seja, que apresentam atividade reprodutiva que culminem na ovulação, descreve que o futuro folículo ovulatório apresenta um aumento progressivo de vascularização um dia antes da divergência até o dia da ovulação (OV). Enquanto folículos subordinados apresentam baixo fluxo sanguíneo ao longo de todo o ciclo (ACOSTA et al., 2004b).

Alterações na ecotextura detectáveis em escala de cinza e Color – Doppler do fluxo sanguíneo podem ser detectáveis na parede do futuro folículo dominante, 1 ou 2 dias antes do início da divergência folicular haver alterações em diâmetro em éguas (ACOSTA et al., 2004b). Depois disto, como o amadurecer folicular e a ovulação se aproximando, várias mudanças na ultrassonografia podem ser vistas na parede do folículo pré-ovulatório.

3.8.2 - Dominância Folicular:

Orlandi (2008) demonstrou que ao iniciar a superovulação (SOV) próximo ao momento da divergência folicular (20-23mm) é possível reduzir o tempo de tratamento mantendo a taxa de OV/égua. Como descrito anteriormente à divergência é precedida por alterações vasculares, e é provável que a US Doppler possa ser uma ferramenta útil para determinar o momento ideal para o início de tratamentos superovulatórios. Entretanto, estudos a esse respeito ainda se fazem necessários.

Em um estudo de Acosta et al., (2004b), observando as alterações vasculares associadas ao início do desvio folicular, o futuro folículo dominante foi avaliado por ultrassonografia com Color - Doppler transretal até o folículo ter cerca de 30 mm (4 dias antes da ovulação). Os resultados demonstraram que o desvio no fluxo de sangue entre os dois maiores folículos ocorreu 1 ou 2 dias antes de desvio de diâmetro durante a seleção do folículo em éguas. Esta conclusão é compatível com uma demonstração anterior de Gastal et al., 1999, de que uma banda circundante anecóica na camada da granulosa do folículo dominante começa a expandir-se diferentemente entre os dois maiores folículos um dia antes do início do desvio de diâmetro.

3.8.3 - Predição de Ovulação:

Ao inseminar éguas com sêmen congelado é imprescindível determinar a iminência da OV para que o depósito do sêmen seja realizado o mais próximo possível do momento da liberação do oócito (SAMPER et al., 2007). A US Doppler acrescenta novas informações quanto à maturação folicular final e a proximidade da OV, podendo ser utilizada para o acompanhamento do desenvolvimento folicular de éguas doadoras de embriões, principalmente quando se utiliza sêmen congelado.

Previsão de ovulação em éguas é uma meta desejável para a indústria equina e para fins de pesquisa. Atualmente, existem agentes hormonais, como gonadotrofina coriônica humana (HCG), o

hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), e LH equino recombinante (LHRH), que podem induzir a ovulação na maioria éguas (60 a 90%) dentro de um tempo previsível após o tratamento (de 24 a 48 horas); no entanto, há uma proporção de éguas (10 a 40%) que não respondem em tempo hábil a administração destes hormônios. Portanto, independentemente do uso ou não de tratamento hormonal, existem várias situações práticas que necessitam da previsão da ovulação iminente dentro de 24 horas ou mesmo dentro de algumas horas (GASTAL e GASTAL, 2011).

De acordo com Pierson e Ginther (1985) e Gastal et al. (2006a), é possível prever o momento da ovulação através da US modo-B, levando-se em consideração alterações morfoecogênicas do folículo dominante. Adicionalmente, a US Doppler surge com um método complementar para prever com maior precisão o momento da ovulação em animais de grande porte.

Alterações na forma do folículo de esférico para não esféricas pode ser notado a partir de 3 dias antes da ovulação, com a frequência mais elevada que ocorre dentro de 24 a 12 horas antes da ovulação (GASTAL et al., 1998).

Em um estudo recente, perda da forma esférica foi associado à diminuição da turgescência folículo, indicado pela pressão do transdutor ocorreu principalmente entre as últimas 24 a 12 horas antes da ovulação (GASTAL et al., 2006b). O aspecto da subjetividade para a avaliação das características anteriores podem produzir resultados diferentes entre os operadores que podem ser pelo menos em parte atribuível aos critérios utilizados para diferenciar entre os folículos e variações esféricas e não esféricas e na pressão do transdutor (GASTAL et al., 1998).

Características discretas e qualitativas, detectadas por modo B têm sido descritas para o folículo pré-ovulatório e podem ser úteis para prever o momento da ovulação, sem a necessidade de avaliar o progresso quantitativo. Estas características incluem o seguinte: 1) Diminuição da turgidez do folículo sob pressão do transdutor (CARNEVALE et al., 1988); 2) perda de forma esférica (PIERSON e GINTHER, 1985); 3) superfície interior irregular da granulosa denominado serrilhado (GINTHER et al., 2007); 4) formato do folículo fino apical em forma de cone ou do mamilo (futuro local ovulação) (PIERSON e GINTHER, 1985); 5) segmentos aparentes destacadas de granulosa ou na parede do folículo (CARNEVALE et al., 1988); 6) pontos ecóicos flutuantes no antro folicular (CARNEVALE et al., 1988).

O futuro folículo ovulatório apresenta um aumento progressivo na vascularização até o dia da ovulação (OV) (ACOSTA et al., 2004b). Gastal et al. (2006b) avaliou as variações de fluxo sanguíneo folicular durante as 36 horas que antecedem a OV espontânea ou induzida com HCG, demonstrando que, em casos de OV espontânea, o fluxo sanguíneo folicular é máximo (80 a 90% da parede folicular apresenta pontos coloridos durante o exame ultrassonográfico entre as horas 36 e 12 que antecedem a OV, e que a quantidade de pixels coloridos Doppler diminui abruptamente durante as últimas quatro horas pré - OV. Já a vascularização do folículo dominante de éguas

tratadas com HCG aumenta progressivamente durante as primeiras 24 horas pós-tratamento e diminui nas quatro últimas horas pré-OV, de forma semelhante ao observado em casos de OV espontânea.

Considerando que o folículo de éguas induzidas com HCG apresentam um aumento na perfusão sanguínea nas primeiras 24 horas e ovulam em média entre 36 e 42 horas pós-tratamento (GASTAL et al., 2006b), a US Doppler permite a avaliação precoce da eficácia de tratamentos indutores de ovulação.

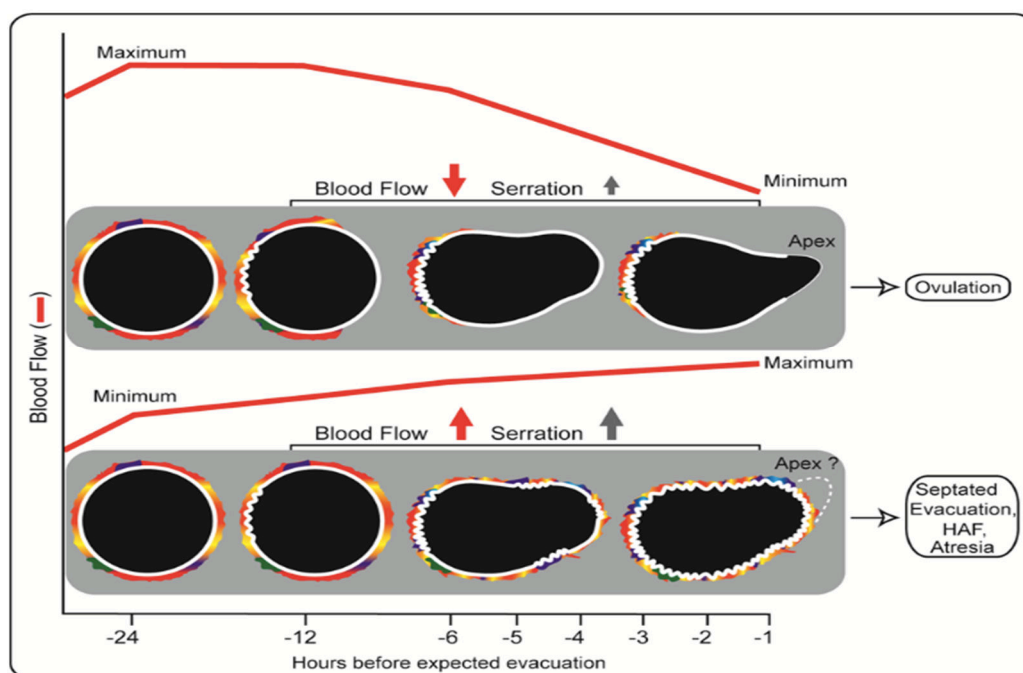


Figura 8: Representação esquemática da proposta de modelo de trabalho, ilustrando a relação entre o fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório e serrilhado da granulosa para éguas com uma ovulação normal versus uma ovulação septada prolongada. Fonte: GASTAL, (2011).

Em ovulações normais, o fluxo sanguíneo folículo atinge o seu máximo, 24 horas antes da ovulação e começa a diminuir significativamente ao longo das 6 horas antes da ovulação. Durante as horas antes da ovulação, a serrilha da granulosa aparece na parede e está associada com sinais de fluxo de sangue na base do folículo e do lado oposto a uma zona apical fina e avascular. Em ovulações septadas, o fluxo sanguíneo do folículo continua a aumentar entre 24 e 1 hora antes do início da ovulação. Sinais de serrilha e cor de fluxo estão dispersas por toda a periferia do folículo, incluindo um potencial região apical (GASTAL e GASTAL, 2011).

3.8.4 - Vascularização do folículo pré-ovulatório em relação à fertilidade:

A avaliação do grau de perfusão sanguínea de folículos avaliados por ultrassonografia Doppler colorido ou Power Doppler, tem sido utilizados como nova tecnologia com potencial para a

produção de estudos clínicos de hemodinâmica ovariana para prever a fertilidade em bovino, equinos e seres humanos (GASTAL e GASTAL, 2011).

O aumento do fluxo sanguíneo do folículo, juntamente com um rápido aumento de LH na fase terminal da maturação folicular, tem sido associada com a retomada da meiose e da realização da maturação dos oócitos. Maior vascularização do folículo pré-ovulatório tem sido associada com maior diâmetro do folículo, a maior taxa de recuperação de oócitos, a maior taxa de recuperação de oócitos maduros a maior taxa de fertilização *in vitro* em éguas (GINTHER et al., 2007) e em novilhas (SIDDIQUI et al., 2009a) bem como o incremento da taxa de prenhez em éguas (SILVA et al., 2006) e em novilhas (SIDDIQUI et al., 2009a). Tendo em vista estes achados encontrados em éguas e em outras espécies, a avaliação do fluxo sanguíneo folicular demonstra-se um parâmetro importante na fertilidade do oócito.

Os estudos utilizados Color e Power - Doppler indicou que o fluxo de sangue do folículo foi maior em éguas (SILVA et al., 2006) e novilhas (SIDDIQUI et al., 2009a) que ficaram prenhas. Em ambos os estudos, as éguas e novilhas foram previamente tratadas com HCG e GnRH, respectivamente, para induzir a ovulação. O fluxo sanguíneo do folículo foi avaliado no momento do tratamento da monta natural ou inseminação artificial. Foram encontradas diferenças estatísticas entre os animais que ficaram prenhas e não prenhas em cada estudo.

No estudo de Silva et al. (2006), ecogenicidade em modo B, a espessura da camada granulosa e a proeminência da banda anecóica abaixo da granulosa aumentou de forma semelhante em ambos os grupos de prenhas e não prenhas. Um aumento no diâmetro do folículo e porcentagem de circunferência folículo com sinais Color Doppler foi maior entre o tempo de tratamento HCG (hora 0) e inseminação artificial (30 horas) no grupo de prenhas que no grupo não prenhas. Medições Espectral - Doppler foram feitas no sinal de cor da artéria ovariana mais proeminente.

Siddiqui et al. (2009a), investigaram o efeito de uma dose de indução de ovulação de HCG, em grupos com presença de anticorpos anti - HCG sobre o fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório, maturidade e a qualidade dos oócitos recuperados às 30 horas pós-tratamento. A porcentagem de parede do folículo com sinais de fluxo de sangue era inferior no grupo positivo para anticorpos do que no grupo negativo. A taxa de recuperação do oócito (62%, 37/60) entre o HCG anti-corpo-positivas (44%) e éguas negativas (68%) tendem a ser diferentes. O grupo positivo para anticorpos teve oócitos menos maduros e mais atípicos que o grupo anticorpos negativos.

Estudos em éguas apontam a hipótese de que o maior fluxo de sangue para o folículo pré-ovulatório é associado com maior folículo e as taxas de maturação do oócito, recuperação de oócitos, índices de qualidade, e taxas de prenhas. Resultados semelhantes foram observados no estudo de novilha (SIDDIQUI et al., 2009a), o que demonstra que os folículos pré-ovulatórios altamente vascularizados são mais susceptíveis de ser associados com maiores taxas de prenhez.

3.8.5- Luteogênese, Funcionalidade e Perfusão Vascular:

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

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 em que ocorre a hipertrofia das células da granulosa (BERGFELT, 2009; GASTAL, 2011).

A luteinização envolve a morfogênese estrutural e funcional das células da granulosa produtoras de estrógeno para células luteais produtoras de progesterona (MURPHY, 2004; BERGFELT e ADAMS, 2007; BERGFELT, 2009).

No início do diestro, 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).

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, sendo funcional por cerca de 14 a 15 dias durante o ciclo não fertilizado, até sofrer luteólise (SAMPER et al., 2007). 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).

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 segura 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).

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 (ARRUDA et al., 2001; SAMPER et al., 2007).

Conforme a maturação do CL ocorre às células luteais aumentam de diâmetro, apresentam núcleo vesiculado e vacúolos pequenos no citoplasma, indicando um aumento de síntese celular e secreção de progesterona. Concomitantemente a 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 esparso, 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).

O corpo lúteo é um dos tecidos mais vascularizados do corpo e durante seu rápido crescimento fisiológico, um intenso processo de angiogênese se inicia (ROBERTO DA COSTA et al., 2005; MULLER et al. 2009) que é essencial para sua formação e desenvolvimento, resultando em uma rede capilar extensa 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 (AL-ZI'ABI et al., 2003).

A quantidade de capilares é tão grande que cada célula lútea pelo menos está em contato com um dos capilares recém-formados (DHARMARAJAN et al., 1985.). 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 e SKARZYNSKI, 2008). Essa redução no diâmetro vascular pode levar a uma diminuição do fluxo sanguíneo, e iniciar ou acelerar o processo de regressão do CL. No corpo albicans ocorre à oclusão dos vasos que desaparecem junto com a estrutura em regressão, reduzindo seu número e densidade (FERREIRA-DIAS e SKARZYNSKI, 2008).

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 e SKARZYNSKI, 2008).

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 do 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 primeiros dias pós - ovulação (GASTAL, 2011).

Bollwein et al., 2002 e Ginther et al., 2007 detectaram 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 ovulações normais. 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).

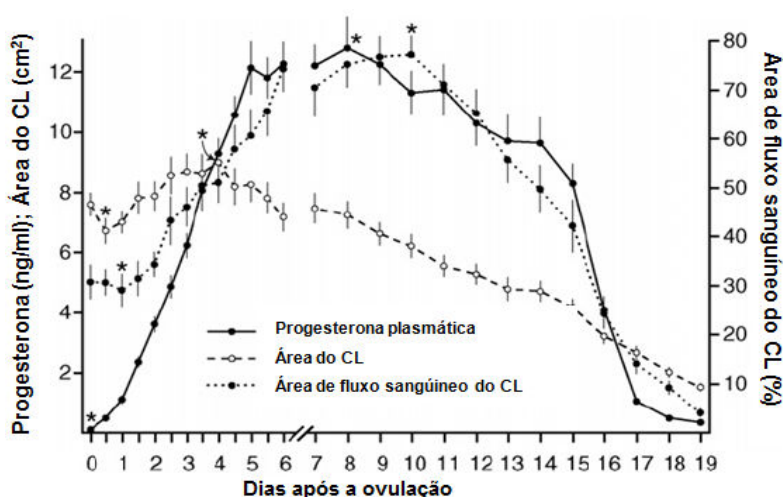


Figura 9: Média (\pm e.p.m) para área luteal, área de fluxo sanguíneo luteal e concentração plasmática de progesterona durante o ciclo estral de éguas com ovulações espontâneas. Asteriscos indicam aumento ou decréscimo significativo ($P < 0,05$) dentro de cada momento. Dia 0 = dia da ovulação. Fonte: Ginther et al., (2007).

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 atingiu 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 (BERGFELT e ADAMS, 2007; 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 (GINTHER et al., 2007b; BERGFELT e ADAMS, 2011).

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

Com o evento da ovulação, tanto estradiol como inibina caem no início do diestro (BERGFELT, 2009). Ocorre um aumento imediato de progesterona no momento da ovulação, iniciando-se a fase luteal e é 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 conseqüente 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 (GINTHER et al., 2007b; AURICH, 2011). A partir de então, as concentrações de progesterona diminuem levemente sem o suporte luteotrófico do LH 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).

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T. J.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 2, p. 637-642, 2004a.

ACOSTA, T.J. et al. Differential blood flow changes between the future dominant and subordinate follicles precede diameter changes during follicle selection in mares. **Biology of Reproduction**, v.71, p.502-507, 2004b.

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.

ALVARENGA, M.A.; MCCUE, P.; SQUIRES, E.L.; NEVES NETO, J.R. Improvement of ovarian superstimulatory. Response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **Theriogenology**, Los Angeles, v.56, p.879-887, 2001.

ALVARENGA, M.A.; CARMO, M.T; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; Superovulation in mares: Limitations and perspectives. **Pferdeheilkunde** ,v.24, p.88-91, 2008.

AL-ZI'ABI, M. O.; WATSON, E. D.; FRASER, H. M. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. **Reproduction**, v. 125, n. 2, p. 259--270, 2003.

ANDRADE, L.S. O ciclo estral da eua e o seu controle endocrino. In: **Fisiologia e manejo da reprodução eqüina**. 2 ed, Recife, p. 57 – 63, 1986.

ARAUJO, G.H.M.; ROCHA FILHO, A.N.; LOPES, E.P.; MOYA, C.F.; ALVARENGA M.A. Use of a low dose to equine purified FSH to induce multiple ovulations in mares. **Reproduction in domestic animals** 44:380-383, 2009.

ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A.; FLEURY, J.J.; GARCIA, A.R.; MADUREIRA, E.D.; CALEGHINI, E.C.C.; NEVES- NETO, J.R..Are there relationships between the luteal size, luteal mor-

- phoechogenicity by ultrasound and plasmatical progesterone concentrations in recipient mares? **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 38, 233-239, 2001.
- AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science**, v.124, n. 3--4, p. 220--228, 2011.
- AZEVEDO, M.V.; SOUZA, N.M.; FERREIRA-SILVA, J.C.; BATISTA, I.O.; MOURA, M.T.; OLIVEIRA, M.A.L.; ALVARENGA, M.A.; LIMA, P.F. Induction of multiple ovulations in mares using low doses of gnrh agonist Deslorelin Acetate at 48 hours after lutelysis. **Pferdeheilkunde Equine Medicine**, v.31, p.160-164, 2015.
- BERGFELT, D. R. Anatomy and physiology of the mare In: SAMPER, J. C. **Equine breeding management and artificial insemination**. 2. ed. St. Luis: Saunders. p. 113--131, 2009.
- BERGFELT, D. R.; ADAMS, G. P. Ovulation and corpus luteum development. In: SAMPER, J.; PYCOCK, J.; MCKINNON, A. O. **Current therapy in equine reproduction**. [S.l.]: Saunders. p.1--13, 2007.
- 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.
- BOLLWEIN, H., R. MAYER, F. WEBER and R. STOLLA: Luteal blood flow during the estrus cycle in mares. **Theriogenology** 57, 2043-2051, 2002.
- BOLLWEIN, H.; MAYER R.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during early pregnancy in mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 597-605, 2003.
- BONAFOS, L. D.; CARNEVALE, E. M.; SMITH, C. A.; GINTHER, O. J. Development of uterine tone in nonbred and pregnant mares. **Theriogenology**, v. 42, p. 1247- 1255, 1994.
- BONIN, B.F., ALVARENGA, M.A. Efeito do Tratamento com Extrato de Pituitária Equina na Resposta Ovariana e Eficiência Reprodutiva de Éguas Idosas em Programa de Transferência de Embriões. **Dissertação F.M.V.Z.** UNESP, Botucatu-SP, 2009.

CARMO, M.T, Disturbs on oocyte transport and maturation of mares superovulated with Equine Pituitary Extract. 156p, PhD Thesis – **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista**, Botucatu-SP, 2007.

CARMO, M.T. TRINQUE, C.L.N.; MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A. Efeito da superovulação com extrato de pituitária equina no transporte de oócitos para o oviduto de éguas. In: XIX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Angra dos Reis, 2005. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33 (suplemento), p.179, 2005.

CARMO, M.T.; LIMA, M.M.; TRINQUE, C.L.N.; MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A. Incidência de ovulações múltiplas unilaterais e bilaterais e suas implicações nos índices de recuperação embrionária em éguas da raça brasileiro de hipismo. In: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Beberibe, 2003. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31 (suplemento), p.282, 2003.

CARNEIRO, G.F. Transferência de embriões em equinos. In: **CONGRESSO BRASILEIRO de REPRODUCAO ANIMAL**, 16, 2005, Goiânia. Anais, 2005.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biology Reproduction** Monogr.. v.1. p. 209-214. 1995.

CARNEVALE, E.M.; MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L. Ultrasonographic characteristics of the preovulatory follicle preceding and during ovulation in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.8, p.428-431, 1988.

CARVALHO, C. F. Ultrassonografia Doppler em pequenos animais. São Paulo: **Roca**. 274p , 2009.

CARVALHO, G.R. Estudo de alguns aspectos da transferência de embriões em equinos. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 103p. **Dissertação (Doutorado em Zootecnia)** 2000.

CERRI, G.G. Avaliação doppler do fígado, sistema portal e vasos viscerais. Doppler. São Paulo: **Sarvier**. cap.6, p.120-121, 1998.

DAELS,P.F.; HUGHES,JP. The normal estrous cycle. In: McKINNON, A.O.;VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger.p 121-132,1993.

DHARMARAJAN, A. M.; BRUCE, N. W.; AND MEYER, G. T. Quantitative ultra structural characteristics relating to transport between luteal cell cytoplasm and blood in the corpus luteum of the pregnant rat. **American Journal of Anatomy**, v. 172, p. 87–99, 1985.

DIELEMAN, S.J.; BEVERES, M.M.;VAN TOL, H.T.M.; WILLEENSE, A.H. Peripheralplasma concentration of estradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the estrous cycles in the cow, with emphasis on the oestrous period . **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 10, p. 275 – 292, 1986.

DIMMICK M.A, GIMENEZ T, SCHILAGER R.L. Ovarian follicular dynamics and duration of estrus and diestrus in Arabian v.s., Quarter Horse mares. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, v. 31, p. 123 – 129, 1993.

FAMILIARI, G.; VIZZA, E.; MIANI, A.; MOTTA, P.M. Ultrastructural and functional development of the theca interna. **Ultrastructure of the ovary**. Boston, MA: Kluwer Academic. p.115-128, 1991.

FARINASSO, A. Utilização de baixas doses de extrato de pituitária equina na indução de ovulações múltiplas em éguas cíclicas.. 60 f. **Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília**, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2004.

FERREIRA J. C.; MEIRA C. Potential use of doppler ultrasound in equine embryo transfer programs. **Ciência Rural, Santa Maria**, V42, N.6, p.1063-1069, jun, 2011.

FERREIRA, J.C.; IGNÁCIO, F.S.; MEIRA, C. Uterine vascular perfusion and spectral-Doppler measurements during early gestation in mares: new concepts of evaluation. **Animal Reproduction Science**, v.121, p. 281–283, 2010.

FERREIRA--DIAS, G.; SKARZYNSKI, D. J. Some aspects of regulation of luteal function and luteolysis in equine corpora lutea. **Pferdeheilkunde**,v.24,p.10--14,2008.

FLEURY, J.J.; ALVARENGA, M.A.; FIGUEIREDO, J.B.; PAPA, F.O. Transferência de embriões em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia** . Porto Alegre, v. 39, n.3, p. 485-487, 1987.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 225-232, 1994.

GASTAL, E.L. e GASTAL, M. O. Equine preovulatory follicle: blood flow changes, prediction of ovulation and fertility. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.239-252, abr./jun. 2011.

GASTAL, E.L. Recent advances and new concepts on follicle and endocrine dynamics during the equine periovulatory period. **Animal Reproduction**, v.6, p.144-158, 2009.

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.]:WileyBlackwell, p. 2032--2054, 2011.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. **Theriogenology**, v. 50, n. 7, p. 1025-1038, 1998.

GASTAL, E.L.; DONADEU, F.X.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Echotextural changes in the follicular wall during follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v.52, p.803-814, 1999.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; DONADEU, F.X.; ACOSTA, T.J.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Temporal relationships among LH, estradiol, and follicle vascularization preceding the first compared with later ovulations during the year in mares. **Animal Reproduction**, v.102, p.314-321, 2007a.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. **Reproduction**, v.131, p.699-709, 2006a.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Serrated granulosa and other discrete ultrasound indicators of impending ovulation in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.26, p.67-73, 2006b.

GINTHER, O. J. : Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**. 24, 516-526 , 2004.

GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2. ed, Wisconsin: **Equiservices**, Cross Plains, 640 p,1992.

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

GINTHER, O. J., M. A. BEG, K. KOT, C. MEIRA and D. R. BERGFELT: Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biol Reprod** 68, 524-529 , 2003.

GINTHER, O. J.: Ultrasonic Imaging and Reproduction: Horses. **Equiservices Publishing, Cross Plains**, WI, USA, 1986.

GINTHER, O. J.; UTT, M. D.; BEG, M. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O. Negative effect of estradiol on luteinizing hormone throughout the ovulatory luteinizing hormone surge in mares. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 543--50, 2007b.

GINTHER, O.J. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color Doppler Ultrasonography. Book 4 **Equiservices Publishing**, Cross Plains, WI, USA – 2007.

GINTHER, O.J., GASTAL, E.L., GASTAL, M.O., BEG, M.A.. Dynamics of the equine preovulatory follicle and periovulatory hormones: what's new? **Journal of Equine Veterinary Science**. 28, 454–460,2008.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; COOPER, D.A. Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17 Gestradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. **Animal Reproduction Science**, v.114,n.1,p.311G317, 2009.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R. Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine estrous cycles. **Journal of reproduction and fertility**. London, v. 99, p. 105 – 111, 1993.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A.; MEIRA, C.; KOT, K.. In vivo effects of an intra-follicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. **Biology of Reproduction**; 70:99–105, 2004c.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O. Spatial relationships between serrated granulosa and vascularity of the preovulatory follicle and developing corpus luteum. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, p.20-27, 2007.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.. Critical role of insulin- like growth factor system in follicle selection and dominance in mares. **Biology of Reproduction**; 70:1374–1379, 2004a.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; CHECURA, C.M.; BEG, M.A.. Dose-response study of intrafollicular injection of insulin-like growth factor- 1 on follicular-fluid factors and follicle dominance in mares. **Biology of Reproduction**; 70:1063–1069, 2004b.

GINTHER, O.J.; MATTHEW, D.U.. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24 p.516-526, 2004.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O. ;BERGFELT, D.R.; BAERWALD, A.R.; PIERSON, R.A. . Comparative study of the dynamic of follicular waves in mares and women. **Biology of Reproduction**, v.71, p. 1195–1201, 2004.

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.; UTT, M.D. Doppler ultrasound in equine reproduction : principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, n. 12, p. 516-526, 2004.

GONSALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadasá Reprodução Animal**. Sao Paulo: Varela, 2002, p. 340.

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

HARRISON, L.A.; SQUIRES, E.L.; ETT, T.M.; MCKINNON, A.O. Comparison of hCG, bursere-lin and luprostitol for induction of ovulation in cycling mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, 11, 163-166, 1991.

HARRISON, L.A.; SQUIRES, E.L.; NETT, T.M.; MCKINNON, A.O. Use of gonadotropinrelea-sing hormone for hastening ovulation in transitional mares. **Journal of Animal Science**, 68, 690-699, 1990.

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

HEAPE, Walter. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 48, n. 292-295, p. 457-458, 1890.

HUGHES, J. P.; COUTO, M. A.; STABENFELD, G. H. Luteal Phase Ovulation : What are the options? **Theriogenology**, v. 26, p. 123-125, 1986.

HUNTER, R.H.F. Physiology of the Graafian follicle and ovulation. **Cambridge, UK: Cambridge University Press**. 2003.

KAWAKAMA, J. ; CERRI, G.G.; ROCHA, D.C. Ultra-sonografia abdominal. São Paulo: **Sarvier**. cap.1, p.1-14, 1993.

MANSO, H.C.F.; SILVA, H.M.M.; SILVA, M.P.M.; MAURÍCIO, E.A.; FERREIRA, L.M.C.; MANSO, H.E.; COSTA, C. Sócio-economia da criação de cavalos no distrito de Aldeia, Camaragi-be – PE, **JEPEX** - 2008.

MAPLETOFT, R.J.; BO, G.A.; PIERSON, R.A. Recruitment of follicles for superovulation . **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian.**, Princeton Junction, v. 16, p. 127 – 141, 1994.

MARTINUK, S.D.; CHIZEN, D.R.; PIERSON, R.A.. Ultrasonographic morphology of the human preovulatory follicle wall prior to ovulation. **Clinical Anatomy**,v. 5 ,339–352, 1992.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. **Theriogenology** 29, 1055-1063, 1988.

MEIRA C.; HENRY M.. Evaluation of two non-surgical equine embryo transfer methods. **Journal of Reproduction** 44(suppl.):712-713, 1991 .

MEIRA, C.; BURATINI, J. Follicular dynamics and superovulation in mares. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**. v. 26, n. 1, p. 125-133, 1998.

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.

MOURA, A. J.C.; MERKT, H. A ultra-sonografia na reprodução eqüina. 2. ed. Salvador, BA: **Editora Universitária Americana**. 162 p, 1996.

MÜLLER,K.; ELLENBERGER,C.; SCHOON,H. Histomorphological and immunohistochemical study of angiogenesis and angiogenic factors in the ovary of the mare. **Research in Veterinary Sciences**, v. 1, p. 1--11, 2009.

MURPHY, B. D. Luteinization. In: ADASHI, E. Y.; LEUNG, P. C. K. **The ovary**. New York: RavenPress.. p.185--195 , 2004.

NAGAO, J.F.; GODOY, T.P.; NETO, JN; DELL'AQUA JÚNIOR, J.A. Indução de ovulações múltiplas em éguas utilizando baixas doses de acetato de delorelina. In:. **Anais da XX IV Reunião anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões –SBTE- Acta Scientiae Veterinariae** (Porto de Galinhas,Pernambuco), 2010.

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.

NISWENDER, K.D.; ALVARENGA, M.A.; MCCUE, P.M.; HARDY, Q.P.; SQUIRES, E.L. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). **Journal of Equine Veterinary Science**, 23, 497-500, 2003.

OGURI, N., TSUTSUMI, Y. Nonsurgical recovery of equine eggs, and na attempt at nonsurgical egg transfer in horse. **Journal Reproduction Fertilit**. London, v. 31, p. 187, 1972.

ORLANDI, C.M.B. Resposta ovariana e concentrações plasmáticas de FSH em éguas submetidas à aspiração folicular e tratadas com extrato de pituitaria eqüina (EPE). 68f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, Botucatu, SP, 2008.

PALMER, E.; CHAVATTE-PALMER, P.; VERDONCK, E. Field trial of Doppler ultrasonography of the preovulatory follicle in the mare. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.182-183, 2006.

PASTORELLO M., MEIRA C., FLEURY J.J. e DUARTE M.C.G. Transferência não cirúrgica de embriões em eqüinos de hipismo. **Arquivo da Faculdade de Veteterinária UFRGS** 24:212, 1996.

PIERSON, R. A. Folliculogenesis and Ovulation. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger. cap. 17, p. 161-171, 1993.

PIERSON, R.A.; CHIZEN, D.R.. Transvaginal ultrasonographic assessment of normal and aberrant ovulation. In: Jaffe R, Pierson RA, Abramowicz JS (Eds.). **Imaging in infertility and reproductive endocrinology**. Philadelphia, P A: J.B. Lippincott. pp.129-142, 1994.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare. **Theriogenology**, v.24, p.359-368, 1985.

PIMENTEL, C.A.;TAROUCO,A.K.;HAMMES,A.M. Ovulações múltiplas em éguas abatidas em Pelotas-RS, **Ciência Rural**, Santa Maria,v.25,n2,p.271-275,1995.

RAZ, T.; GREEN, J.; CORRIGAN, M.; CARD, C. Folliculogenesis, embryo parameters, and post-transfer recipient pregnancy rate in eFSH-treated donor mares. In **Proceedings of the 52nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, San Antonio, USA, 2-6 December, pp.393-397. USA: AAEP, 2006.

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.

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.

SAMPER, J. C. Ultrasonographic appearance and the pattern of uterine edema to time ovulation in mares. **Proceedings of American Association Equine Practice**. v. 43, p. 189-191, 1997.

SAMPER, J.C. et al. Insemination with frozen semen. In: RUDOLPH, P.; GOWER, J. (Ed.). **Current therapy in equine reproduction**. Missouri: Saunders Elseviers. p.285- 288, 2007.

SCHERZER, J.; FAYRER-HOSKEN, R.A.; RAY, L.; HURLEY, D.J.; HEUSNER, G.L. Advancements in Large Animal Embryo Transfer and Related Biotechnologies. **Reproduction in Domestic Animals**, 43(3), 371-376, 2008.

SHIRAZI, A.; GHARAGOZLOO, F.; GHASEMZADEH-NAVA, H. Ultrasonic characteristics of preovulatory follicle and ovulation in Caspian mares. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 261-266, 2004.

SIDDIQUI, M.A. ; ALMAMUN, M.; GINTHER, O.J. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.113, p.287-292, 2009a.

SILVA, L.A. Ultrassonografia Doppler na reprodução equina: presente e futuro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária + Equina**, v.29, p.66-77, 2010.

SILVA, L.A.; GASTAL, E. L.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology of Reproduction**, .v.72(3), p.755-761, 2005.

SILVA, L.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. **Anim Reprod**, v.3, p.339-346, 2006.

SIROIS, J.; BALL, B. A.; FORTUNE, J. E. Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the estrous cycle and after hemiovariectomy in mares. **Equine Veterinary Journal**, p. 43-48. supplement. 8, 1989.

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, Supplement, 2, 2008.

SQUIRES, E.L. Superovulation in Mares. **Veterinary Clinics Equine** 22:819-830, 2006.

SQUIRES, E.L.; MCCLAIN, M.G.; GINTHER, O.J.; MCKINNON, A.O. Spontaneous multiple ovulation in the mare and its effect on the incidence of twin embryo collections. **Theriogenology** , Los Altos, v. 28, p. 609 – 613, 1987

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M. Superovulation in mares. **Animal reproduction science**, – Elsevier., 2007.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D.K.. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology** 51:91-104, 1999.

SZATMÁRI, VIKTOR, PÉTER SÓTONYI, AND KÁROLY VÖRÖS. "Normal duplex Doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a review." **Veterinary Radiology & Ultrasound** 42.2: 93-107, 2001.

TAVEIROS, A.W, OLIVEIRA M.A.L., LIMA. P.F. Estratégias de manejo para aumentar a eficiência reprodutiva de fêmeas equinas da raça mangalarga machador. Tese de Doutorado, **Programa de pós-graduação em Ciência Veterinária da UFRPE**, 2008.

WATSON, E. D.; THOMASSEN, R.; NIKOLAKOPOULOS, E. Association of uterine edema with follicle waves around the onset of the breeding season in pony mares. **Theriogenology**, v. 59, p. 1181-1187, 2003.

WEBB, R., CAMPBELL, B.K., GARVERICK, H.A., GONG, J.G., GUTIERREZ,C.G.; ARMSTRONG, D.G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal Reproduction Fertility**, Suppl.54, 33-48, 1999.

WILLETT, E. L. et al. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. **Science** (New York, NY), v. 113, n. 2931, p. 247, 1951.

ZÚCCARI, C.E.S.N., D.B. NUNES E R.A.C. CORRÊA FILHO. Eficiência reprodutiva de éguas da raça pantaneira durante as estações de monta 1995/2000. **Archivos de zootecnia**. 51: 139-148. 2002.

5- ARTIGOS CIENTÍFICOS:**5.1 CAPÍTULO I**

AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DOPPLER DA VASCULARIZAÇÃO OVARIANA DE ÉGUAS SUBMETIDAS A UM PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE DUPLA OVULAÇÃO

Sonographic evaluation doppler of vascularization mares subject of ovarian for a protocolo double
ovulation

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

¹ Autor, Doutorando 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 Mestrando em Ciência Animal, pela UFRPE Recife-PE BR. End: Rua Projetada s/n, Florianópolis, Lagoa Seca –PB CEP 58117-000, E-mail: marlon.a.vet@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se induzir ovulações múltiplas em éguas utilizando baixas doses de GnRH (deslorelina); avaliar a viabilidade folicular após tratamento superovulatório através do acompanhamento ultrassonográfico doppler dos folículos subordinados e dominante; e detectar alterações vasculares que precedem o momento da divergência. Foram utilizadas seis éguas doadoras de embrião da raça Mangalarga Machador, com idade entre cinco e dez anos, em plena atividade reprodutiva. O G1 consistiu na aplicação de 7,5 mg de dinoprost-trometamina e monitoramento diário do ciclo estral com o Modo-B, acrescentando o uso do Modo-Doppler, uma vez ao dia, a partir de folículos com 25 mm até a ovulação. A indução de ovulação e a inseminação artificial foram realizadas no mesmo momento, quando o folículo atingia de 33 a 35 mm de diâmetro e edema uterino grau 2 a 3. O G2 diferenciou-se do G1 quando detectado o maior folículo entre 23 a 25mm e o segundo >18mm, iniciando-se o tratamento superovulatório até que o maior folículo atingisse 33 a 35mm, sendo realizada neste momento a indução de ovulação. O percentual de éguas com ovulações múltiplas no G1 foi de 0% (0/6) e no G2 foi de $0,833 \pm 0,372$ (5/6) ($P < 0,05$). Taxa de crescimento folicular G1 $2,79 \pm 0,34$, G2 FD $3,37 \pm 0,55$, G2 F-cD $2,64 \pm 0,82$ ($P > 0,05$). A vascularização da parede folicular, G1 FD $31,93 \pm 10,11$, G2 FD $31,33 \pm 8,82$ e do G2 F-cD $32,54 \pm 9,23$ ($P > 0,05$) e do G1 Fsub, $12,92 \pm 0$ ($P < 0,05$). Conclui-se que a administração de GnRH em baixa dose em doadoras de embrião, interferiu positivamente no crescimento do folículo dominante e co-dominante e na taxa de vascularização do folículo co-dominante, sem haver interferência na taxa de crescimento médio de ambos os folículos avaliados. Em relação as alterações vasculares que precedem o momento da divergência, constatou-se que o folículo subordinado possui menor vascularização um dia antes da divergência, não apresentando auteração durante todo ciclo e que o folículo dominante tem aumento progressivo da sua vascularização. Desta forma observou-se um aumento na incidência de duplas

ovulações, refletindo em uma maior taxa de recuperação embrionária por ciclo, permitindo um incremento na eficiência reprodutiva das éguas tratadas em programa comercial de transferência de embriões.

Palavras-chave: Embrião, baixa dose GnRH, Foliculo dominante, foliculo co-dominante, dupla ovulação.

ABSTRACT

It was aimed to induce multiples ovulations in mares using low doses of GnRH (deslorelin); evaluate the follicular viability after super ovulatory treatment through doppler ultrasound tracking of the subordinate and dominant follicle; and detect vascular changes that precede the divergence time. It was used 6 donor mares of Magalargamarchador breed, between 5 and 10 years old, in reproductive activity. The group one consisted in applying 7,5mg of dinoprost-tromethamine and dairy monitoring the estrous cycle with the mode-B, adding the use of Doppler mode, once a day, from 25mm follicles until the ovulation. The ovulation induction and the artificial insemination were performed at the same time, when the follicle reached 33 to 35mm of diameter and uterine edema grade 2-3. The G2 distinguishes from G1 when the biggest follicle was detected between 23 – 25mm and the following >18mm, starting the super ovulatory treatment until the biggest follicle reached 33-35mm, when ovulation induction was performed. The percentage of mares with multiples ovulations in G1 was 0% (0/6) and in G2 was $0,833 \pm 0,372$ (5/6) ($P < 0,05$). The follicular growth rate in G1 was $2,79 \pm 0,34$, G2 FD $3,37 \pm 0,55$, G2 F-cD $2,64 \pm 0,82$ ($P > 0,05$). The follicular wall vascularization was in G1 FD $31,93 \pm 10,11$, G2 FD $31,33 \pm 8,82$ and in G2 F-cD $32,54 \pm 9,23$ ($P > 0,05$) and G1 Fsub, $12,92 \pm 0$ ($P < 0,05$). It was concluded that the administration of GnRH in low doses in donor mares interfered positively at growth of dominant and co-dominant follicles and at the vascularization rate of the co-dominant follicle, without having any interference at average growth rate of both assessed follicles. Regarding the vascular changes that precede the divergence time, it was found that there is a decrease of vascularization at the subordinate follicle, 24 hours before the divergence, and an increase of vascularization in the dominant follicle. Therefore it was found an increase in double ovulation rate, reflecting in a highest embryo recovery rate in each cycle, allowing an increase at the reproductive efficiency in mares that were treated in a commercial program of embryo transference.

Key words: embryo, GnRH low dose, dominant follicle, co-dominant follicle, double ovulation.

INTRODUÇÃO

O acompanhamento da dinâmica folicular em éguas é realizado rotineiramente por meio da ultrassonografia convencional, levando-se em consideração alterações morfoecogênicas (GASTAL et al., 1998). Porém, a tecnologia doppler oferece uma nova alternativa para avaliação do desenvolvimento e potencial ovulatório de folículos dominantes (FERREIRA et al., 2011) devido a mudanças na hemodinâmica ovariana, as quais podem ser detectadas durante todo desenvolvimento folicular e estão relacionadas com o remodelamento do tecido ovariano e do sistema vascular responsável por sua irrigação (GINTHER, 2007).

Em éguas, o período de transição é caracterizado pelo desenvolvimento de ondas foliculares maiores anovulatórias. Nessa fase, folículos dominantes anovulatórios apresentam taxa de crescimento e dimensões semelhantes ao observado durante a estação reprodutiva, entretanto, um aumento progressivo na vascularização a partir da divergência ocorre somente em futuros folículos ovulatórios, enquanto folículos anovulatórios possuem baixa vascularização independentemente de seu diâmetro (ACOSTA et al., 2004).

Acredita-se que isto está relacionado a diminuição na concentração de LH resultando em diminuição na concentração de estradiol, VEGF e inibina o que promove a um aumento na concentração de FSH e contínuo crescimento folicular (GINTHER et al., 2003).

Orlandi (2008), demonstrou que ao iniciar a superovulação (SOV) próximo ao momento da divergência folicular (20-23mm) é possível reduzir o tempo de tratamento mantendo a taxa de OV/égua. Como a divergência é precedida por alterações na vascularização folicular, é provável que a US Doppler seja uma ferramenta útil para determinar o momento ideal para o início de tratamentos superovulatórios. Entretanto, estudos a esse respeito ainda se fazem necessários.

A indução de ovulações múltiplas na espécie equina não é um procedimento tão eficaz quando comparado a outras espécies domésticas (NISWENDER et al., 2003), devido principalmente a dois fatores: a anatomia do ovário e a ausência de um produto que induza ovulações múltiplas de forma precisa, resultando em taxas de recuperação embrionária inconsistentes e abaixo das expectativas (SQUIRES, 2006).

O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) têm-se tornado uma alternativa para a indução de duplas ovulações, haja vista que Ginther e Bergfelt (1990) ao tratar éguas fora da estação de monta, por longos períodos com baixa dose de GnRH-A (análogos de GnRH), demonstraram haver um incremento no número de ovulações duplas em comparação ao grupo controle. Nagao et al., (2010) utilizando baixa dose de GnRH, relatou um percentual de ovulações duplas por ciclo de 85% assim como Azevedo et al., (2015), com 86,66 %, ampliando assim as possibilidades de uso deste hormônio.

Portanto, objetiva-se induzir múltiplas ovulações em éguas utilizando baixas doses de GnRH; avaliar a viabilidade folicular após tratamento superovulatório através do acompanhamento ultrassonográfico doppler e modo B dos folículos subordinados e dominante e detectar alterações vasculares que precedem o momento da divergência.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado durante a estação reprodutiva 2014 e 2015 entre os meses de setembro a fevereiro, período sem incidência de chuva, na Central de Reprodução Equestre, localizada no município de Itabaiana, a uma latitude 7° 19' 44" sul e a uma longitude 35° 19' 58" oeste, a uma altitude de 45 metros, situada na região agreste do estado da Paraíba.

Foram utilizadas seis éguas doadoras de embrião, da raça Mangalarga Machador, com idade entre cinco a dez anos e pesando 350 a 450 Kg. As éguas foram selecionadas por meio de exame clínico ginecológico, atestando sua higidez. Os animais foram mantidos em baias com feno de Tifton (*Cynodon nlemfuensis*), água e sal mineral (Kromium[®], Tortuga[®], Brasil) *ad libitum* e 4 kg de ração equitagem laminados (Guabi[®] nutrição animal) peletizada, dividida em dois fornecimentos ao dia.

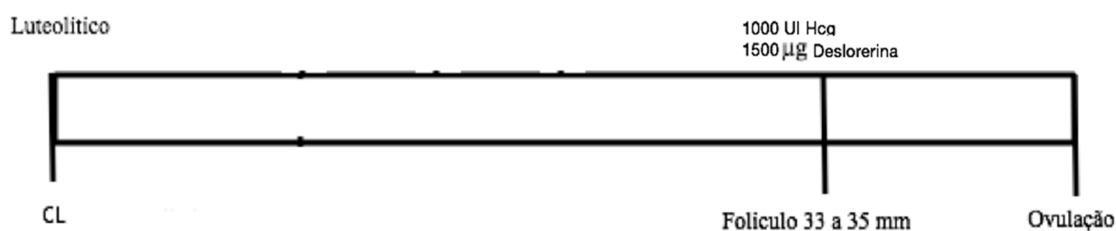


Figura 01- Demonstrativo do tratamento controle, Grupo G1.

O Grupo controle (G1), consistiu na aplicação de 7,5 mg de dinoprost-trometamina e monitoramento diário do ciclo estral com o Modo-B, acrescentando o uso do Modo-Doppler a partir de folículos com 25 mm até a ovulação, uma vez por dia. A indução de ovulação e a inseminação artificial foram realizadas no mesmo momento, quando o folículo atingia de 33 a 35 mm de diâmetro e edema uterino grau 2 a 3. Para indução da ovulação utilizou-se 1500 µg de acetato de desloreterina intramuscular (IM) (Sincrorelina[®], Ouro Fino, Brasil) associado a 1000 UI de hCG intravenosa (IV), Chorulon[®], MSD Saúde Animal, Brasil). A colheita de embrião foi realizada no oitavo dia pós-ovulação.

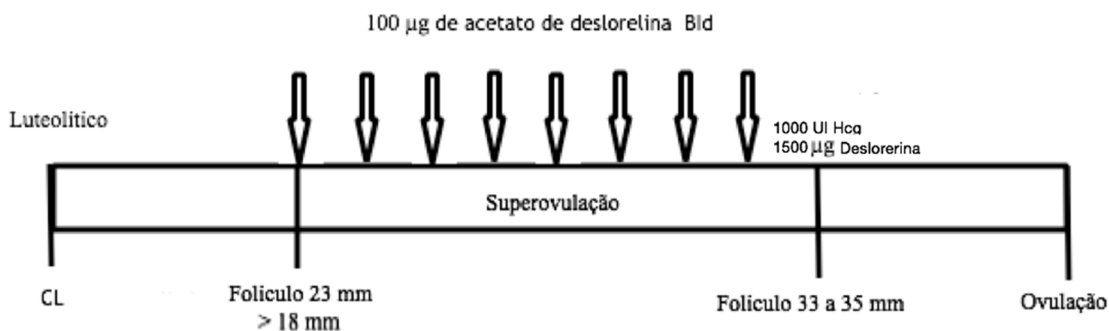


Figura 2- Demonstrativo do tratamento indutor de dupla ovulação, Grupo G2.

O Grupo experimental (G2), consistiu da aplicação de 7,5 mg de dinoprost-trometamina, sendo realizados os exames de ultrassom modo B uma vez ao dia, iniciando no dia da aplicação do agente luteolítico, até detecção do maior folículo com diâmetro de 23 a 25 mm e o segundo folículo \geq a 18mm, quando foi iniciado o tratamento superovulatório, com 100 μ g de acetato de deslorelina, a cada 12 h, até que o maior folículo atingisse o diâmetro de 33 a 35 mm, momento que foi realizado a indução da ovulação com 1500 μ g de acetato de deslorelina (IM) (Sincrorelina[®], Ouro Fino, Brasil) associado a 1000 UI de hCG IV.

Os exames ultrassonográficos nos dois grupos foram executados com o auxílio do aparelho S2V, SonoScape[®] Co., Ltda, China, Equipado com Transdutor transretal linear de 10-5 Mhz, foram realizados diariamente iniciando no dia da aplicação do agente luteolítico com Modo-B e a partir do folículo com 22 mm de diâmetro foi iniciado a ultrassonografia Modo-Doppler, uma vez ao dia. Após a indução de ovulação passou a ser realizada em um intervalo de 12 horas.

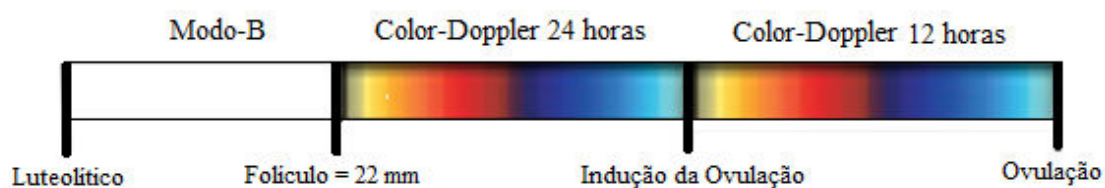


Figura 3 – Demonstrativo dos exames ultrassonográfico Modo-B e Modo Color-Doppler, realizado nos dois grupos.

A perfusão vascular (PV) dos folículos foi avaliada de forma subjetiva, como descrito por Ginther et al., (2007), levando em consideração o percentual de parede folicular com a presença de pontos coloridos (pixels) Doppler, durante um exame contínuo de um minuto de duração, tendo como orientação o diagrama APÉNDICE A.

A avaliação espectral Doppler foi realizada na artéria ovariana ipsilateral ao ovário com crescimento folicular e no contra lateral, durante o mesmo exame. Foram avaliados os seguintes índices Doppler: Índice de Resistência (RI), Índice de Pulsatilidade (PI), Pico de Velocidade Sistólica (m/s), (PSV), Pressão sistólica final (mmHg), (Pg), Tempo de desaceleração (s), Pico de Velocidade (cm/s), (PeaKV), Aceleração (cm/s²), (AccV), Na análise espectral Doppler do G2 para o folículo co-dominante, foram utilizadas apenas os dados dos ciclos com crescimento folicular nos dois ovários simultaneamente, por não ser possível diferenciar a vascularização da artéria ovariana para o ovário com dois folículos em crescimento.

O GnRH (Acetato de Deslorelina) utilizado no trabalho, como indutor de dupla ovulação, foi produzido no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, Unesp-Botucatu, SP, Brasil.

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 da parede do folículo foram transformados em arcoseno. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual de éguas com ovulações múltiplas no (G1) foi de 0% (0/6) e no (G2) foi de $0,83 \pm 0,37$ (5/6) ($P < 0,05$). A média de ovulação no G1 foi de $1,00 \pm 0,00$ e de $1,86 \pm 0,23$ no G2 ($P < 0,05$). Em um dos ciclos foi observado falha da ovulação, com desenvolvimento de folículo hemorrágico em um dos dois folículos em desenvolvimento, com o co-Dominante chegando a ovulação no ovário contra lateral ao folículo hemorrágico, possibilitando assim a produção de embrião. Nos ciclos com mais de uma ovulação as mesmas ocorreram em intervalo de tempo médio de 4 horas.

Quanto a produção de embriões verificou-se que o G1 teve 3, enquanto que o G2 7, com uma média de embriões por ciclo de $1,16 \pm 0,27$ e no G1 $0,50 \pm 0,50$ ($P < 0,05$). O percentual de embriões por ovulação foi de 50 % (3/6) no G1 e 54,54% (11/6) no G2. Tendo um percentual de lavados positivos de 50% no G1 e G2 foi de 100%.

Tabela 1 – Resultados da produção embrionária, número de ovulações, média de dupla ovulação e taxa de recuperação embrionária por lavado, para o Grupo Controle (G1) e Grupo Experimental (G2) tratado com baixa dose de Deslorelina (GnRH), durante a estação reprodutiva 2014/2015, na Equestre Central de Reprodução Equina, Itabaina-PB.

VARIÁVEIS	G1	G2
Número de Animais	6,00	6,00
Número Ovulações	6,00	11,00
Ovulações por Égua	1,00 ± 0 a	1,83 ± 0,27 b
Éguas com Dupla Ovulações	0,00 a	0,83 ± 0,37 b
Número de Embriões	3,00	7,00
Embriões por ciclo	0,50 ± 0,50a	1,16 ± 0,27b
Embriões por Ovulação (%)	50 %	54,54%
Lavado Positivo (%)	50%	100%

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

\bar{X} : Média; EPM Erro Padrão da Média

Neste experimento o tratamento com análogo de GnRH (G2) foi capaz de estimular com eficiência a indução de ovulações múltiplas, tendo em vista que a média de éguas com duas ovulações foi de $0,83 \pm 0,37$ (5/6) enquanto o G1 foi de 0 (0/6), o que corresponde em percentual a 83,33% e 0 %, respectivamente. Apresentando maiores resultados do que os reportados para tratamentos com baixa dose de EPE, como os relatados por Bonin et al., (2009) com 65%; Douglas (1979) 75,00%; Farinasso (2004) 76,90%; Carmo (2009) 84,00%; e Rocha Filho (2004) 30,80%. Estudos utilizando baixa dose de GnRH apresentam valores próximos aos encontrados nesse experimento, como Nagao et al., (2010) com 85,00% e Azevedo et al., (2015) com 86,66%.

Na tabela 1 observa-se que houve um incremento no número de ovulações com o uso do GnRH em baixas doses, 6 ovulações no G1 para 11 no G2, com uma média de $1,00 \pm 0,23$ no G1 e de $1,83 \pm 0,27$ no G2, ($P < 0,05$) concordando com Ginther e Bergfelt (1990), Nagao et al., (2010) e Azevedo et al., (2015), que obtiveram um aumento no número de múltiplas ovulações nas éguas submetidas ao tratamento com análogo de GnRH, obtendo 75,00% e 85,00% e 86,66% de éguas com ovulações múltiplas, respectivamente.

Em um dos ciclos no G2 foi observado falha da ovulação com desenvolvimento de folículo hemorrágico o que seria esperado segundo Lapin e Ginther (1997) para éguas submetidas a tratamento superovulatório.

Este aumento no número de ovulações resultou em um incremento no número de embriões recuperados que no G1 foi de apenas três, enquanto no G2 foi de 7,00 embriões, com uma média de $0,50 \pm 0,50$ no G1 e de $1,16 \pm 0,27$ no G2 ($P < 0,05$), concordando com Ginther, (1993) e Carmo et al., (2009), os quais relatam que o aumento na taxa de ovulação aumenta o número de embriões recuperados. A média do grupo G2 foi muito próxima aos resultados reportados por Carmo et al., (2009) utilizando EPE, na dose de 25,00 mg, Bid, obteve a média 1,1; Bonin et al., (2009) utilizando EPE, na dose de 7,0 mg, Bid, obteve a média de 1.

No experimento o tratamento com baixa dose de GnRH é capaz de produzir apenas ovulações duplas, como descrito em trabalhos anteriores de Nagao et al.,(2010) e Azevedo et al.,(2014), Azevedo et al.,(2015), possivelmente não ocorra mais ovulações devido ao tratamento com GnRH estimular apenas a liberação endógena de gonodotrofinas e o nível máximo atingido seja incapaz de manter o crescimento de mais de dois folículos. Este fato também foi observado por Azevedo et al., (2015) que ao iniciar o tratamento com baixa dose de GnRH precocemente, 48h após a aplicação do agente luteolítico, onde houve um maior recrutamento folicular, três ou quadro folículos, mais nenhum chegou a dominância.

A indução de ovulação realizada neste experimento, trata-se da associação de dois farmacos indutores, acetato de deslorelina e Hcg, está associação se fazes necessária devido a continua estimulação da secreção de FSH e LH da adeno-hipofise, dinduzida pelo tratamento com baixa dose de GnRH, exaurino as reservas de LH endógena, o que torna o tratamento apenas com GnRH insuficiente para induzir a ovulação.

A média de recuperação embrionária do G1 $0,50 \pm 0,50$ observa-se que foi semelhante a relatos anteriores como (0,60 embriões/ciclo) Alvarenga et al., (2008) e de 0,70 reportada por Hunt et al., (2005).

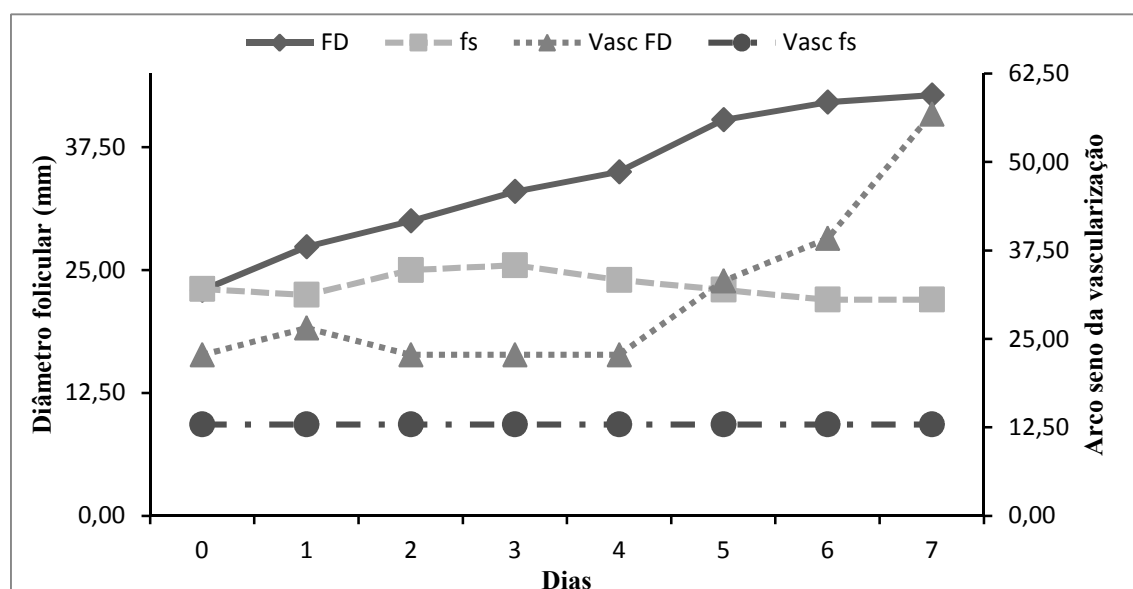
O número de embriões recuperados por ovulação foi de 50,0 % (3/6) no G1 e 54,54% (11/6) no G2. Comparando com resultados encontrados em outros trabalhos utilizando EPE nossos resultados mostram-se superiores aos dados encontrados por Alvarenga (2001); Scoggin et al., (2002); Carmo et al., (2009); Machado et al., (2003), onde obtiveram 49,00%, 43,20%, 30,20% e 26,00%, respectivamente.

A taxa de recuperação embrionária por lavado foi de 50,00% no G1 e de 100,00% no G2, resultados superiores aos reportados por Guimaraes et al., (2007) 72,70% utilizando tratamento com EPE em baixa dose e por Taveiros et al., (2008) com 86,30% sem tratamento superovulatório. Os resultados comprovam a ação do GnRH, como dito por Greaves et al., (2001) que este hormônio é o regulador mais expressivo da secreção de LH e FSH em éguas. Sua ação provavelmente aumentou os níveis de FSH e LH cicurlantes, possibilitando a co-dominância folicular, culminando com ovulações duplas nas éguas tratadas com baixas doses dessa substância.

Tabela 2 – Crescimento Folicular Médio e Tamanho Folículo Médio do Folículo Dominante no G1 e do Folículo Dominante no G2 e do Folículo Co-Dominante no G2. G2 ciclos tratados com baixa dose de Deslorelina (GnRH), durante a estação reprodutiva 2014/2015, na Equestre Central de Reprodução Equina, Itabaina-PB.

VARIÁVEIS	G2		
	G1 $\bar{X} \pm \text{EPM}$	Dominante $\bar{X} \pm \text{EPM}$	Co-Dominante $\bar{X} \pm \text{EPM}$
Tamanho folicular médio	32,06 \pm 6,79a	32,46 \pm 7,70a	28,975 \pm 6,73b
Crescimento folicular médio	2,79 \pm 0,34a	3,37 \pm 0,55a	2,64 \pm 0,82a

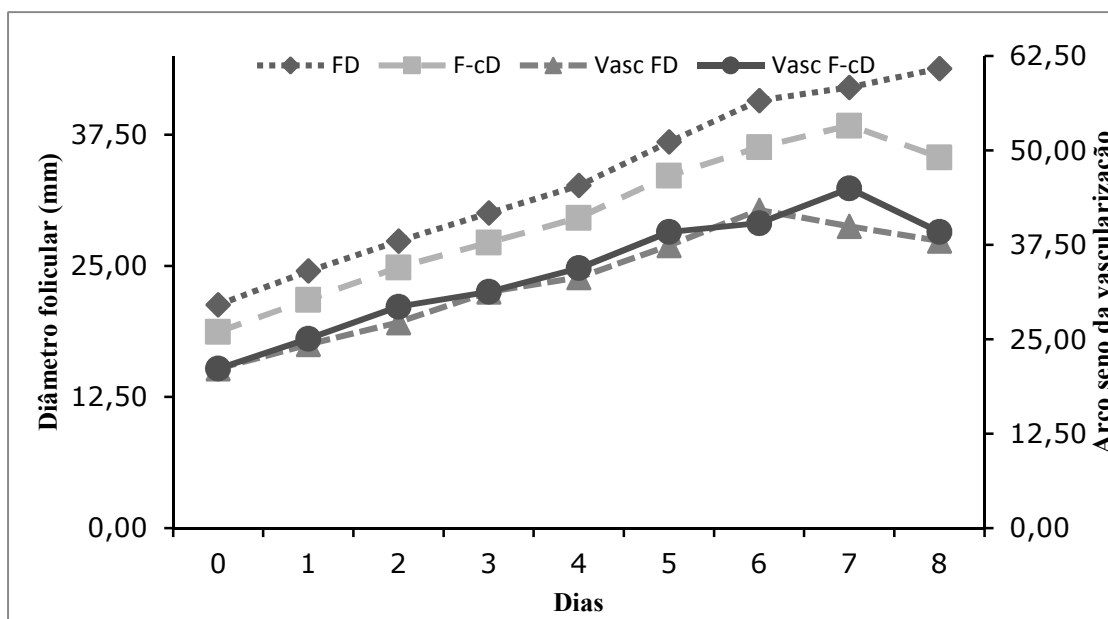
Letras diferentes na mesma linha, ($P < 0,05$).
 \bar{X} : Média; EPM Erro Padrão da Média



D0 é referente ao dia de início dos exames modo Doppler

FD: Folículo Dominantes; fs: Folículo subordinado; Vasc FD: Vascularização Folículo Dominante; Vasc fs: Vascularização folículo subordinado.

Figura 4 - Crescimento folicular e da vascularização do folículo dominante e subordinado no G1.



O D0 é referente ao dia de início do modo doppler e tratamento de dupla ovulação.

FD: Foliculo Dominantes; F-cD: Foliculo Co-Dominante; Vasc FD: Vascularização Foliculo Dominante; Vasc F-cD: Vascularização foliculo co-Dominante.

Figura 5 - Crescimento folicular e da vascularização do Foliculo Dominante e Co-Dominante no G2.

O crescimento do foliculo dominante (FD) e do foliculo Co-dominante (F-cD) no G2 (Figura 5), ocorre de forma semelhante ao FD do G1 (Figura 4) seguindo a mesma média de crescimento por dia, FD G1 $2,79 \pm 0,34$, FD G2 $3,37 \pm 0,55$, F-cD G2 $2,64 \pm 0,82$ ($P < 0,05$), estando próximo dos 3 mm de crescimento médio descrito por Ginther et al., (2008), demonstra que o tratamento com baixa dose de GnRH estimula a liberação suficiente de gonodrofinas possibilitando um perfeito desenvolvimento dos dois folículos, com totais condições de gerar um embrião viável.

O tamanho folicular médio do G1 $32,06 \pm 6,79$, do G2 FD $32,46 \pm 7,70$ e do G2 F-cD $28,97 \pm 6,73$, foi observado diferença ($P < 0,05$) no F-cD o que também pode ser observado na Figura 5, possivelmente este menor diâmetro deve-se ao fato do F-cD iniciar seu crescimento um pouco menor em relação ao FD o que leva a uma asincronia na ovulação, com o F-cD ovulando 4 a 12 horas após o FD.

No gráfico 1 observa-se que após o FD atingir a divergência (> 25 mm), o foliculo subordinado (Fs) entra em atresia, diminuindo de diâmetro e mantendo a baixa vascularização, enquanto que a vascularização do FD tem um crescimento ascendente. A PV do Fs se mantém baixo durante todo o ciclo, estando mais baixo que o FD um dia antes da divergência, como descrito por Acosta et al.,(2004).

Tabela 3 – Vascularização percentual média da parede folicular e média dos índices Doppler Velocimétricos: RI, PI, PSV, Pg, Tempo de Desaceleração, PeaKV, AccV; Para G1 FD, G1 Fs, G2 FD e G2 F-cD. G1 ciclos Controle e G2 ciclos tratados com baixa dose de Deslorelina (GnRH), durante a estação reprodutiva 2014/2015, na Equestre Central de Reprodução Equina, Itabaina-PB.

VARIÁVEIS	G1		G2	
	FD	Fs	FD	F-cD
PV parede do foliculo(%)	31,93±10,11a	12,92±0,00b	31,33±8,82a	32,54 ±9,23a
RI	0,83±0,01a	0,87±0,028a	0,832±0,034a	0,84±0,06a
PI	2.46±0,09a	2,38±0,40a	2,164±0,23 a	2,38 ±0,40a
PSV (m/s)	42,15±7,98a	58,955±6,85a	64,22±8,19a	69,24 ±8,91a
Pg (mmHg)	0,812±0,28a	1,46±0,32a	1,76±0,42a	2,02 ±0,53a
Tempo de Desaceleração (s)	0,32 ±0,02a	0,44±0,95a	0,33±0,05a	0,32 ±0,01a
PeaKV (cm/s)	42,92±17,79a	114,23±37,05a	64,47±18,01 a	70,06±19,23a
AccV (cm/s ²)	114,23±37,05a	114,23±37,05a	159,71±37,45a	167,95±9,6a

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

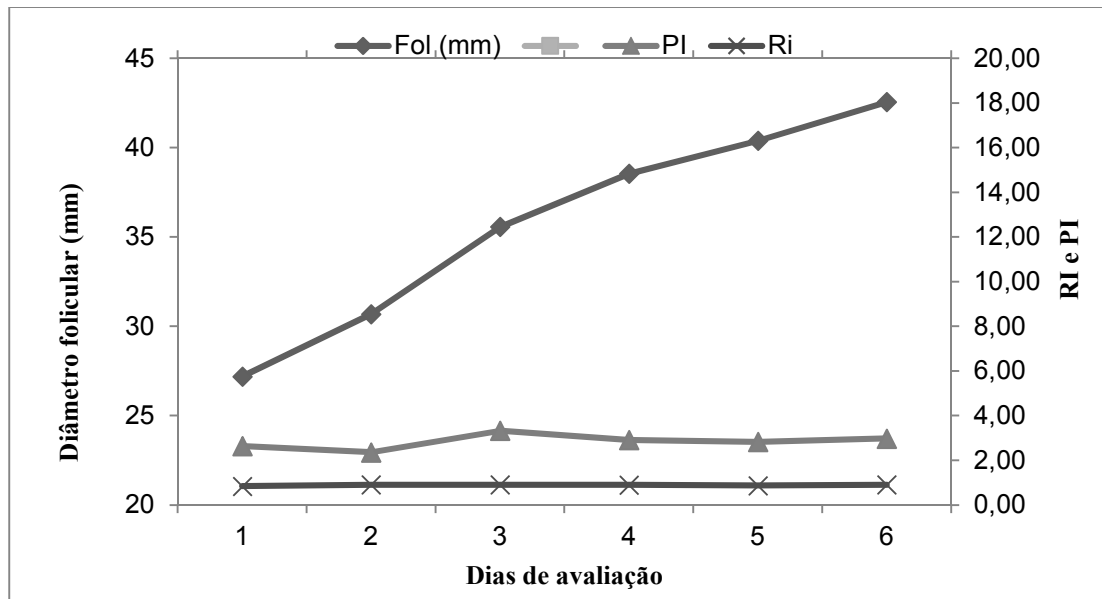
Índice de Resistencia(RI), Índice de Pulsatilidade (PI), Pico de Velocidade Sistólica (PSV), Pressão Sistólica Final (Pg), Tempo de desaceleração, Pico de Velocidade Sistólica (PeaKV), Aceleração (AccV), Foliculo Dominante (FD), Foliculo Subordinado (Fs), Foliculo Co-Dominante (F-cD)

Foram utilizados no G2 apenas os ciclos que tiveram desenvolvimento folicular em ovários diferentes.

Na tabela 3 observa-se que não há diferença nos índices doppler velocimétricos da artéria ovariana ($P>0,05$). Segundo Ferreira et al., (2011) isso ocorre devido a artéria ficar relativamente distante da área de interesse e se ramificar, irrigando outros tecidos, sofrendo influência de diversos fatores não relacionados ao ovário, outro fato é que seguindo Ginther, (2007) a mensuração adequada das velocidades de fluxo sanguíneo no exame espectral é dependente da angulação correta (ângulo Doppler) entre o transdutor e o vaso sanguíneo avaliado, porém a grande tortuosidade das artérias presentes nos ovários e no útero, não permite determinar os seus respectivos ângulos Doppler, porém RI e PI não sofrem influência do ângulo Doppler e neste estudo não foi observado diferença estatística entre os índices Doppler analisados, demonstrando que estes RI e PI também não retratam as alterações do fluxo sanguíneo durante o ciclo.

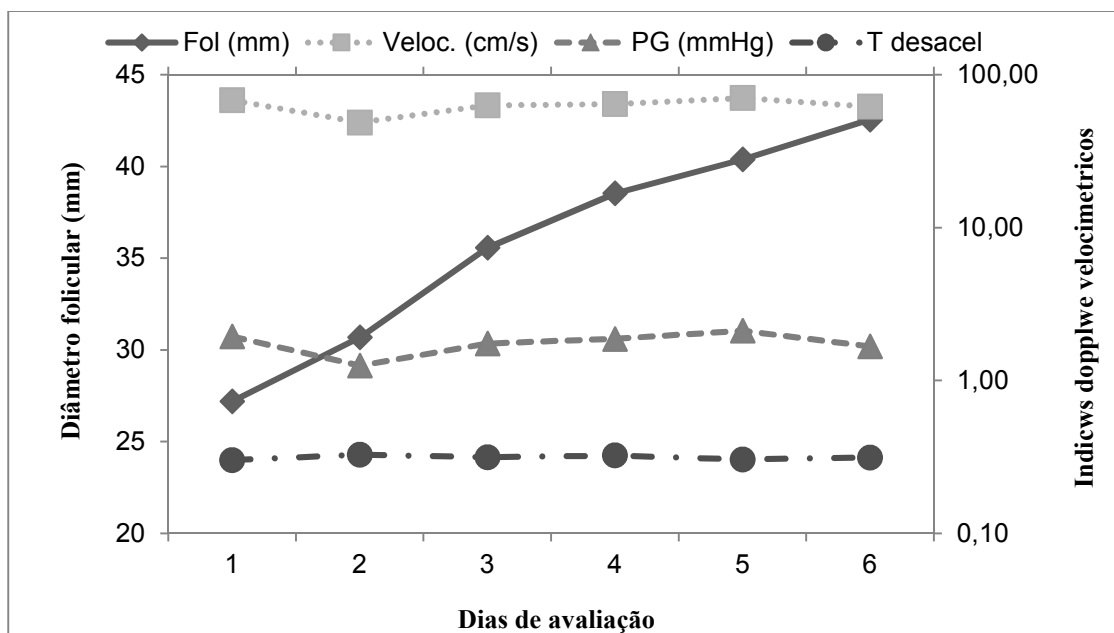
A avaliação da vascularização da parede do folículo apresenta diferença ($P<0,05$) entre o folículo subordinado e os demais G1FD, G2FD e F-cD, demonstrando que o tratamento indutor de dupla ovulação estimulou a liberação de gonodotrofinas pela adeno-hipofise em nível suficiente para o desenvolvimento do F-cD demonstrado pelo desenvolvimento capilar folicular, que está relacionado com o nível intrafolicular do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que sofre influência direta de LH. Espresando que esta técnica tem maior sensibilidade em relação a avaliação espectral da artéria ovariana, sendo uma técnica de avaliação mais rápida e prática, não necessitando de sedação ou contenção física, possibilitando uma avaliação em tempo real da perfusão sanguínea do folículo.

As Figura 6 e 7 correlacionam a variação dos índices Doppler velocimétricos e crescimento folicular. Não há diferença ($P>0,05$) entre os dias do ciclos, o que nos leva a inferir que estes índices sofrem interferência de outros fatores, não inerentes a dinâmica folicular.



1 refere-se ao primeiro dia de exame modo Doppler

Figura 6 – Desenvolvimento do folículo e da média dos Índices Doppler velocimétricos RI e PI.



1 refere-se ao primeiro dia de exame modo Doppler

(Veloc) Velocidade Distólica Final em cm/s, (PG) Corresponde de pressão em mmHg, (T. Desacel) Tempo de Desaceleração.

Figura 7 – Desenvolvimento dos Índices Doppler Velocimétricos: (Veloc.) em cm/s, PG em mmHg, T. Desacel. em s.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a administração de GnRh (Acetato de Deslorelina) em baixa dose foi efetivo em estimular o crescimento do folículo co-dominante sem interferir no desenvolvimento do folículo dominante, elevou a taxa de vascularização do folículo co-dominante, sem alterar a perfusão vascular do folículo dominante, aumentando assim a incidência de duplas ovulações, refletindo em uma maior taxa de recuperação embrionária por ciclo. As alterações vasculares que precedem o momento da divergência, constatou-se que a vascularização do folículo subordinado já é menor um dia antes da divergência não alterando durante o ciclo e que o folículo dominante apresenta aumento progressivo da vascularização, durante todo o ciclo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T.J.; GINTHER, O.J. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. **Biology of Reproduction**, v.71, p.637-642, 2004b.

ALVARENGA, M.A.; MCCUE, P.; SQUIRES, E.L.; NEVES NETO, J.R. Improvement of ovarian superstimulatory. Response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **Theriogenology**, Los Angeles, v.56, p.879-887, 2001.

ALVARENGA, M.A.; CARMO, M.T.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Superovulation in mares: Limitations and perspectives. **Pferdeheilkunde**, v.24, p.88-91, 2008.

AZEVEDO, M. V.; SOUZA, N.M.; FERREIRA-SILVA, J.C.; BATISTA, I. O.; MOURA, M.T.; OLIVEIRA, M.A.L.; ALVARENGA, M.A.; LIMA, P.F. Induction of multiple ovulations in mares using low doses of GnRH agonist Deslorelin Acetate at 48 hours after luteolysis. **Pferdeheilkunde Equine Medicine**, v.31, p.160-164, 2015.

BONIN, B.F. ; DELLAQUA, J.R.J A.; ALVARENGA, M.A. Ovarian response and embryo recovery rates of old mares treated with a low dose of equine pituitary extract. **Reproduction, Fertility and Development** 22(1) 241–241, 2009.

CARMO, M.T.; LOSINNO, A.L.; AGUILAR, B.J.; ROSE, B.J.; ARAUJO, C.G.H.M.; ALVARENGA, M.A. Levels of hormones and nitric oxide present in follicular fluid under or not under superovulation in mares. **Reproduction, Fertility and Development** 22(1) 359–359 December 2009.

DOUGLAS, R.H. Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine, **Theriogenology**, v.11, p.33-46, 1979.

FARINASSO, A.; BRANQUINHO, J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização de baixas doses de extrato de pituitária equina (EPE) para indução de ovulações múltiplas em éguas. **Acta Scientiae Veterinariae** 33 (suppl.1): 135-138, 2005.

FERREIRA, J.C.; IGNÁCIO, F.S.; MEIRA, C. Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares.. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, p.105-111, 2011.

GASTAL, E.L. et al. The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. **Theriogenology**, v50 p.1025-1038, 1998.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Relationships of changes in B-mode echotexture and color-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. **Reproduction** 131, 699-709, 2006.

GINTHER, O J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 311-320, 1990.

GINTHER, O.J. e BERGFELT, D.R. Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rate and on follicular development during the ensuing pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, 88, 119-126, 1990.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R. Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine estrous cycles. **Journal of Reproduction and Fertility**, London, v. 99, p. 105 –111, 1993.

GINTHER, O.J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. **Equiservices**,(2.ed.) Cross Plains, WI p 299-300, 499-545 e 642, 1993.

GINTHER, O.J. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color Doppler Ultrasonography. Book 4 **Equiservices Publishing**, Cross Plains, WI, USA, 2007.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Dynamics of the equine preovulatory follicle and periovulatory hormones: what's new? **Journal of Reproduction and Fertility**, 28, 454–460,2008.

GREAVES, H.E.; KALARIOTES, V.; CLEAVER, B.D.; PORTER, 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.

GUIMARÃES, J.D et al. Taxas de recuperação embrionária em programa comercial de transferência de embriões em éguas da raça Mangalarga Machador. **Acta Scientiae Veterinariae: SBTE,UFRGS,Porto Alegre, V35. Supl.3,p.1220, 2007.**

HUNT. C; AGUILAR ,J.; SPORLEDER, C.; LOSINNO, L. The Effect of donor mare age on efficiency of a large scale embryo transfer programe. **Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 2005.**

LAPIN, D.R.; GINTHER, O.J. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine pituitary extract. **Journal of Animal Science** ,v.44, n.5, p.834-842, 1977.

MACHADO, M.S. Dinâmica folicular, número de ovulações e embriões recuperados em éguas submetidas a tratamento superovulatório, utilizando-se extrato de pituitária equina e FSH equino purificado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** v.27, n.3, p.506, 2003.

NAGAO, J.F.; GODOY, T.P.; NETO, JN; DELL'AQUA JÚNIOR, J. A. Indução de ovulações múltiplas em éguas utilizando baixas doses de acetato de delorelina. In: **Acta Scientiae Veterinariae. XX IV –SBTE-** (Porto de Galinhas,Pernambuco), 2010.

NISWENDER, K.D.; ALVARENGA, M.A; MCCUE, P.M.; HARDY, Q.P.; SQUIRES, E.L. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). **Journal of Equine Veterinary Science**, 23, 497-500, 2003.

ORLANDI, C.M.B. Resposta ovariana e concentrações plasmáticas de FSH em éguas submetidas àaspiração folicular e tratadas com extrato de pituitaria equina (EPE).2008. 68f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu**, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP.

ROCHA FILHO, A.N.; PESSOA, M.A.; GIOSO, M.M.; ALVARENGA, M.A. Uso de progesterona de longa ação na preparação de éguas não ciclantes como receptoras de embrião. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Barra Bonita, **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, P.89, 2004.

SILVA, L.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. **Animal Reproduction**, v.3, p.339-346, 2006.

SCOGGIN, C.F.; MEIRA, C.; MCCUE, P.M.; CARNEVALE, E.M.; NETT, T.M.; SQUIRES, E.L. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. **Theriogenology**, v.58, p.151-164, 2002.

SQUIRES E.L. Superovulation in Mares. **Veterinary Clinics Equine** 22:819-830, 2006.

TAVEIROS, A.W; MELO, P. R.M.; FREITAS NETO, L.M.; AGUIAR FILHO, C.R.; SILVA, A.C. J.; LIMA, P.F.; OLIVEIRA, M.A.L. Produção de embriões de éguas Mangalarga Machador utilizadas nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil. **Medicina Veterinária**, v.2, p.19-24, 2008.

5.2 CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO POR ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER DA VASCULARIZAÇÃO DO CORPO LÚTEO E DO ÍNDICE DE PREENHIZ DE RECEPTORAS, EM UM PROGRAMA COMERCIAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO EQUINO.

Ultrasonography for assesment of doppler corpus luteum vascularization and recioents of pregnancy rate in program commercial equine embryo transfer.

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

¹ Autor, Doutorando 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 Mestrando em Ciência Animal, pela UFRPE Recife-PE BR. End: Rua Projetada s/n, Floriano, Lagoa Seca-PB CEP

58117-000

E-mail: marlon.a.vet@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se descrever uma relação entre a taxa de prenhez de receptoras de embrião e a perfusão vascular do CL, como também entre a concentração de P4, com o dia da ovulação e com o tônus uterino. Correlacionar os níveis de P4 com a perfusão vascular e com as dimensões do CL. Avaliar a vantagem da utilização do modo Doppler para seleção de receptoras de embrião. Validar a análise subjetiva correlacionando com a análise objetiva. Foram utilizadas 15 éguas mestiças iniciando o experimento com o agente luteolítico e o monitoramento ultrassonográfico modo-B até que o maior folículo atingisse de 33 a 35 mm e o endométrio apresentasse edema dois ou três, momento que foi realizado a indução da ovulação, seguindo com ultrassonografia modo-B, até a detecção da ovulação. A inovulação ocorreu entre o 4º e 6º dia pós ovulação e o diagnóstico de prenhez quando o embrião estava com 16 dias, quando foram divididas em dois grupos Prenhas (G1) e Vazias (G2). A ultrassonografia modo Color-Doppler foi realizada no momento da inovulação. O índice de Prenhez encontrado foi de 53,33%, a concentração de P4 foi de G1 $10,64 \pm 1,13$ e G2 $7,19 \pm 3,49$, ($P > 0,05$). A PV CL objetiva G1 $1216,97 \pm 74,45$ e G2 $661,81 \pm 117,11$, ($P < 0,05$). Na PV CL subjetiva $51,00 \pm 2,07$ e $48,45 \pm 2,15$, ($P > 0,05$), Área do CL G1 $7,66 \pm 0,36$ e G2 $7,41 \pm 0,91$, ($P > 0,05$), diâmetro do CL G1 $31,53 \pm 1,84$ e G2 $30,68 \pm 1,82$, ($P > 0,05$). PV subjetiva endométrio, G1 $1,87 \pm 0,39$ e G2 $2,14 \pm 0,43$, ($P < 0,05$), PV objetiva endométrio, G1 $357,56 \pm 103,93$ e G2 $181,37 \pm 54,60$; tônus uterino $2,75 \pm 0,36$ e G2 $2,57 \pm 0,40$, ($P > 0,05$). Correlação entre P4 e a PV CL objetiva $r = 0,63$ ($P < 0,05$) e com PV CL Subjetiva $r = 0,69$, ($P < 0,05$), entre o PV do CL objetiva e subjetiva $r = 0,66$ ($P < 0,05$). Entre as dimensões do CL e o nível plasmático de P4 obteve-se, Diâmetro CL $r = -0,28$ ($P > 0,05$) e Área do CL $r = -0,20$ ($P > 0,05$). Entre a área e o diâmetro do CL $r = 0,98$ ($P < 0,05$), dimensões do CL com a PV CL Objetiva $r = 0,03$ ($P > 0,05$). Entre o tônus uterino e o nível plasmático de P4 $r = 0,25$ ($P > 0,05$), com o PV CL Objetivo $r = 0,29$ ($P > 0,05$) e com o diâmetro do CL $r = -0,29$ ($P > 0,05$). Conclui-se que a PV CL é indicativo de prenhez por refletir a concen-

tração plasmática de P4, sendo a PV CL a melhor análise para seleção de receptoras tendo em vista que a concentração plasmática de P4 tem correlação significativa com a PV CL objetiva e subjetiva e não apresenta correlação significativa com as dimensões do CL e com o Tônus uterino. A avaliação subjetiva é eficaz, sendo um método mais prático e em tempo real para determinar a funcionalidade do CL.

Palavras-chave: Color-Doppler, Inovulação, Perfusão Vascular, Égua.

ABSTRACT

The objective was to describe a relationship between embryo recipients pregnancy rate and perfusion vascular CL, as well as between the P4, the day of ovulation and the uterine tone. P4 levels correlate with vascular perfusion and dimensions CL. Determine the Doppler evaluation of qualities to check embryo recipients. Validate the subjective analysis correlating with objective analysis. We used 15 mares starting the experiment with luteolytic agent and monitoring ultrasonográfico B-mode until the largest follicle reached 33 mm and endometrial present edema 2 or 3, carried ovulation induction, ultrasound B-mode, until ovulation. The embryo transfer took place between the 4th and 6th day after ovulation and pregnancy diagnosis when the embryo was 16 days. Dividindoas in pregnant (G1) and empty (G2). Ultrasound Color-Doppler was performed at the time of invulção. The pregnant rate found was 53.33%, the concentration of P4 is G1 and G2 10.64 ± 1.13 7.19 ± 3.49 ($P > 0.05$). PV CL lens G1 and G2 1216.97 ± 74.45 661.81 ± 117.11 ($P < 0.05$). In PV CL subjective 51.00 ± 2.07 and 48.457 ± 2.15 ($P > 0.05$), CL area G1 7.66 ± 0.36 and 7.41 ± 0.91 G2 ($P > 0.05$), diameter CL G1 31.53 ± 1.84 and 30.68 ± 1.82 G2 ($P > 0.05$). PV subjective endometrium, G1 and G2 1.87 ± 0.39 2.14 ± 0.43 ($P < 0.05$), PV objective endometrium, G1 and G2 357.56 ± 103.93 181.37 ± 54.60 ; uterine tone G2 2.75 ± 0.36 and 2.57 ± 0.40 ($P > 0.05$). Correlation between P4 and PV objective CL $r = 0,63$ ($P < 0,05$) and PV CL Subjective $r = 0,69$, ($P < 0,05$), between the CL PV objective and subjective $r = 0,66$ ($P < 0,05$). Among the dimensions of the plasma level CL and P4 are obtained, CL diameter $r = -0,28$ ($P > 0,05$) and CL area CL $r = -0,20$ ($P > 0,05$). Among the area and the diameter CL $r = 0,98$ ($P < 0,05$), with the dimensions CL Lens PV $r = 0,03$ ($P > 0,05$) with the uterine tone and P4 serum levels $r = 0,25$ ($P > 0,05$) and Purpose with the PV CL $r = 0,29$ ($P > 0,05$) and the diameter LC $r = -0,29$ ($P > 0,05$). It follows that the largest PV CL rate in pregnant recipients on the day of embryo transfer and strong positive correlation between plasma concentration of P4 and vascular perfusion luteal, associated with the absence of dimensional changes of the CI, the uterine tone has moderate correlation between the tone and P4 and pregnancy, indicating that the Doppler technology is a more effective method to Mode-B ultrasound for assessment of luteal function and the strong correlation between the PV CL objective and PV CL subjective validates this method, being more practical and easy.

Keywords: Color-Doppler, embryo transfer, Vascular Perfusion, Mare.

Introdução

Manutenção e gestão de éguas receptoras é a maior despesa recorrente em um programa de transferência de embrião (TE), sendo o manejo um dos fatores que mais interferem na taxa de prenhez (SQUIRES et al., 1999; STOUT, 2006). No entanto, apesar das tentativas para selecionar as receptoras adequadas com base na data da ovulação, condição uterina e tônus cervical (CARNEVALE et al., 2000) nem todos os embriões de boa qualidade irão se desenvolver.

Embora a qualidade do embrião seja de extrema importância para a manutenção da gestação, a sincronia entre doadora e receptora, bem como o dia de ovulação são determinantes no sucesso da TE (HENDRIKS et al., 2015; MORTENSEN et al., 2009; LOVE et al., 2002). Atualmente, éguas adequadamente sincronizadas são selecionadas para receber um embrião com base na data de ovulação, tônus uterino e ausência de quaisquer anomalias durante a avaliação ultrassônica modo-B de o trato reprodutor.

A janela de transferência para éguas receptoras mais utilizada é 1 dia antes (d+1) e 3 dias depois (d-3) da égua doadora (STOUT, 2003). Porém uma janela mais ampla tem sido sugerida por Wilshire e Allen (2009) que transferindo embriões D10 (Dia 0 = ovulação), para receptoras que tinham ovulado um dia antes da transferência (d-7) observaram embriões com batimentos cardíacos em 37,5% (3/8) das éguas e Wilsher et al. (2010) alcançaram taxas de prenhez entre 100% (08/08) e 63% (08/05) ao transferir embriões D10 para receptoras com graus de sincronia variando entre +2 e -6 dias.

O corpo lúteo começa a produzir progesterona e, quando a concentração plasmática supera 1 ng/mL, inicia-se o diestro (NEELY et al., 1979). A concentração de progesterona aumenta rapidamente, atingindo o pico aproximadamente no dia 6 do ciclo, quando mantém um platô (HUGHES et al., 1972), sendo o desenvolvimento, regressão e funcionalidade luteal estritamente relacionados com o rápido desenvolvimento e regressão de um extenso sistema vascular local (GINTHER et al., 2007).

Tendo em vista que a ultrassonografia Doppler é um método confiável, não invasivo (MIYAMOTO et al., 2005) e possui uma íntima relação entre a perfusão sanguínea luteal e a função secretora do CL; objetivou-se descrever uma relação entre a taxa de prenhez de receptoras de embrião e a perfusão vascular do CL, como também entre a concentração de P4, dia da ovulação e o tônus uterino. Correlacionar os níveis de P4 com a perfusão vascular e com as dimensões do CL. Determinar as qualidades da avaliação modo Doppler para avaliação de receptoras de embrião. Validar a análise subjetiva correlacionando com a análise objetiva.

Material e Métodos

O experimento foi realizado durante a estação reprodutiva 2014/2015 durante os meses de setembro a fevereiro, período sem incidência de chuvas, na Equestre, Central de Reprodução Equina, 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 15 éguas mestiças, com idade entre cinco a dez anos, pesando 350 a 450 Kg. Foram selecionadas por meio de exame clínico ginecológico, comprovando sua hígidez, com escore corporal de 3 a 4. Os animais foram mantidos a pasto de *Panicum maximum*, cultivar mombaça, com água e sal mineral (Kromium[®], Tortuga[®], Brasil) *ad libitum*.

O experimento teve início com a aplicação de 7,5 mg de dinoprost-trometamina (Lutalyse[®], Zoetis, Brasil) via intramuscular (IM) e monitoramento ultrassonográfico modo-B até que o maior folículo atingisse 33 mm e o endométrio apresentasse edema 2 ou 3 (GUINThER, 1995), quando foi realizado a indução da ovulação com 1500mg de acetato de deslorelina (Sincrorelina[®], Ourofino Saúde Animal, Brasil) (IM), seguindo com os exames ultrassonográficos modo-B, diariamente, até a ovulação ser detectada.

As 15 éguas foram inovuladas entre o 4° e 6° dia pós ovulação e o diagnóstico de prenhez realizado quando o embrião estava com 16 dias. Após o diagnóstico foram divididas entre, Prenha (G1) e Vazia (G2). 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, SonoScape Co., Ltda, China, Equipado com Transdutor transretal linear de 10-5 Mhz.

A área (mm²) 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 da 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), seguindo o APÉNDICE B, a avaliação da PV do endométrio foram pontuadas em escore de 1 a 4, sendo 1 menor vascularização e 4 máxima vascularização, de acordo com o APÉNDICE C.

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 à 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, foram levados 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 (SiO₂) de 4 ml e agulha 25x8 múltipla com capa de borracha. A mensuração de P4 foi determinada por um sistema automatizado de quimioluminescência (Immulite I® 103, Siemens Healthcare Diagnostics Ltd., Los Angeles, 104 CA, USA) utilizando um imunoenensaio 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 intra-ensaio de 5,8 a 16%.

Os dados climáticos foram obtidos no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), da Estação meteorologia Automática (A313) localizada no Município de Campina Grande, PB (Latitude -7,23; Longitude -35,91). Os dados foram coletados a cada dia de inovulação. Foram compilados os dados diários da Temperatura ambiental média (°C) e umidade do ar média (%). Foi calculado também o Índice Temperatura Umidade (ITU) médio diário, obtido segundo a fórmula de Thom, 1959, ITU: $(0,8 \times TM + (UM/100) \times (TM-14,4) + 46,4)$, onde ITU: Índice Temperatura e Umidade médio.

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 quando ($P < 0,05$). Antes das análises, dados percentuais para vascularização do corpo lúteo na análise subjetiva, foram transformados em arcoseno $\sqrt{P/100}$. 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

O índice de Prenhez encontrado foi de 53,33%, a concentração de P4 foi de G1 $10,64 \pm 1,13$ e G2 $7,19 \pm 3,49$, ($P > 0,05$), observado apenas diferença numérica, provavelmente pelo reduzido número de animais. A avaliação a PV CL objetiva obtivemos G1 $1216,97 \pm 74,45$ e G2 $661,81 \pm 117,11$, ($P < 0,05$), mostrando que a maior vascularização interfere positivamente no índice de prenhez. Na PV CL subjetiva $51,00 \pm 2,07$ e $48,45 \pm 2,15$, ($P > 0,05$), quanto à área do CL G1 $7,66 \pm 0,36$ e G2 $7,41 \pm 0,91$, ($P > 0,05$), diâmetro do CL G1 $31,53 \pm 1,84$ e G2 $30,68 \pm 1,82$, ($P > 0,05$),.

PV subjetiva endométrio, G1 $1,87 \pm 0,39$ e G2 $2,14 \pm 0,43$, ($P < 0,05$), PV objetiva endométrio, G1 $357,56 \pm 103,93$ e G2 $181,37 \pm 54,60$; tônus uterino $2,75 \pm 0,36$ e G2 $2,57 \pm 0,40$, ($P > 0,05$), de-

monstrando que o tônus uterino é um parâmetro muito subjetivo, quanto ao número de dias da ovulação G1 $5 \pm 0,26$ e G2 $4,28 \pm 0,79$, ($P < 0,05$).

Tabela 1: Análise de Progesterona (P_4), Dimensões do Corpo Lúteo (CL) e Perfusão Vascular (PV) do CL e endométrio nos grupos G1 Prenhas e G2 Vazias. Estudo realizado durante a estação reprodutiva 2014/2015, nos meses de setembro a março, na Equestre, Central de Reprodução Equina, Itabaiana – PB.

VARIÁVEIS	PRENHAS (G1) $\bar{x} \pm \text{EPM}$	VAZIA (G2) $\bar{x} \pm \text{EPM}$
P4 (ng/ml)	$10,64 \pm 1,13$ a	$7,19 \pm 3,49$ a
PV CL Objetiva	$1216,97 \pm 74,45$ a	$661,81 \pm 117,11$ b
PV CL Subjetiva	$51,00 \pm 2,07$ a	$48,45 \pm 2,15$ a
Área CL (Cm ²)	$7,66 \pm 0,36$ a	$7,41 \pm 0,91$ a
Diam. CL (mm)	$31,53 \pm 1,84$ a	$30,68 \pm 1,82$ a
PV Endométrio Subjetiva	$1,87 \pm 0,39$ a	$2,14 \pm 0,24$ a
PV Endométrio Objetiva	$357,56 \pm 103,93$ a	$181,37 \pm 54,60$ a
Tônus Uterino	$2,75 \pm 0,36$ a	$2,57 \pm 0,40$ a
Dias de ovulação	$5 \pm 0,26$ a	$4,28 \pm 0,18$ a
ITU	$83,04 \pm 0,43$ a	$83,23 \pm 0,79$ a

Significância ($P < 0,05$).

\bar{x} : Média, EPM: Erro Padrão da Média, ITU: Índice de Temperatura e Umidade.

Ao analisar a tabela 2, observam-se as correlações entre as diversas variáveis, tendo uma forte correlação entre P4 e a PV CL Objetiva $r = 0,66$ ($P < 0,05$) e PV CL Subjetiva $r = 0,63$ ($P < 0,05$), entre as formas de analisar a PV do CL objetiva e subjetiva foi obtido $r = 0,66$ ($P < 0,05$). Entre as dimensões do CL e o nível plasmático de P4 obtiveram-se, Diâmetro do CL $r = -0,28$ ($P > 0,05$) e Área do CL $r = -0,02$ ($P > 0,05$). Foi observado entre a área e o diâmetro do CL $r = 0,98$ ($P < 0,05$), entre as dimensões com a PV CL Objetivo $r = 0,03$ ($P < 0,05$), entre o tônus e o nível plasmático de P4 $r = 0,25$ ($P > 0,05$) e com o PV CL Objetivo $r = 0,29$ ($P > 0,05$) e com o diâmetro do CL $r = -0,29$ ($P > 0,05$).

Tabela 2: Correlações entre Progesterona (P₄), Perfusão Vascular (PV) do Corpo Lúteo (CL) nas análises objetiva e subjetiva, dimensões do CL, PV do endométrio e Tônus Uterino, utilizando os dados dos animais dos dois grupos. Estudo realizado durante a estação reprodutiva 2014/2015, nos meses de setembro a março, na Equestre, Central de Reprodução Equina, Itabaiana – PB.

VARIÁVEIS	CORRELAÇÃO	VALORES DE P
PV Cl Objetivo x PV Cl Subje-	0,66	$P < 0,05$
P4 x PV CL Objetivo	0,63	$P < 0,05$
P4 x PV CL Subjetivo	0,69	$P < 0,05$
P4 x Diâmetro CL	-0,28	$P > 0,05$
P4 x Área do CL	-0,20	$P > 0,05$
P4 x PV do endométrio	-0,30	$P > 0,05$
Diâmetro CL x Área CL	0,98	$P < 0,05$
Diâmetro CL x PV CL Objeti-	0,03	$P > 0,05$
Área CL x PV CL Objetivo	0,03	$P > 0,05$
P4 x Tônus Uterino	0,25	$P > 0,05$
Tônus x Diâm.	-0,29	$P > 0,05$
Tônus x PV CL Objetivo	0,29	$P > 0,05$

Discussão

O índice de prenhez encontrado foi de 53,33% superiores aos dados reportados por Wilshire e Allen. (2009) 37,5% (3/8) e próximo aos 63% de Wilsher, et al., (2010). No G1, foi observada diferença ($P < 0,05$) PV CL Objetiva, demonstrando que este índice tem interferência positiva na taxa de prenhez, possivelmente por sua relação com o índice de P4. Esta interação já havia sido demonstrada por Dharmarajan, et al., (1996), ao realizar histologia de CLs observando a quantidade de capilares do CL e descrevendo que cada célula lútea está em contato com pelo menos um capilar, sendo o corpo lúteo um dos tecidos mais vascularizados do corpo.

Esta interação entre P4 e a PV CL também foi descrita por Ginther et al., (2007a); (2007b); (2008) por ultrassonografia Doppler, o qual demonstra mudanças simultâneas da concentração plasmática de P4 e do fluxo sanguíneo do CL. Esta proliferação de células endoteliais é estabelecida com uma rede capilar densa e ocorre durante as primeiras fases de desenvolvimento do CL, necessária para a síntese e secreção de P4, como descrito por Ginther, (1992) e Alziabi, et al., (2003), como exemplificado pela correlação entre a PV CL Subjetiva e os níveis de P4, $r = 0,69$ ($P < 0,05$), demonstrando que o aumento de P4 repercute no aumento da PV do CL, sendo a tecnologia Doppler a mais eficiente nesta avaliação.

A moderada correlação $r = 0,66$ ($P < 0,05$) encontrada entre a PV CL Objetiva e a PV CL Subjetiva, valida a análise subjetiva, demonstrando sua eficácia o que possibilita uma avaliação em tempo real, viabilizando a utilização prática desta técnica na seleção de receptoras. Apesar da relação existente entre os modos de avaliação Doppler do CL, não foi encontrado diferença entre os grupos quanto à avaliação subjetiva, acreditamos que seja pela maior escala utilizada para fazer a avaliação subjetiva.

A alta correlação encontrada em nosso trabalho, entre a PV subjetiva do CL e P4, $r = 0,69$ ($P < 0,05$), também foi descrita em éguas com a ovulação espontânea por Bollwein, et al., 2002, por Ginther, et al., 2007 e Romano, 2013. Foi observada correlação inexistente entre a área do CL e perfusão vascular lútea $r = 0,03$ ($P > 0,05$) ou concentração plasmática de P4 $r = -0,2$ ($P < 0,05$), como relatado por Arruda et al. (2001), que demonstrou que a atividade funcional secretora de CL equino não depende do seu tamanho, da mesma forma Bollwein et al., (2002) não encontraram correlação entre o diâmetro lúteo e do fluxo sanguíneo ovariano.

Segundo Bergfelt e Adams. (2011) ao avaliar apenas o diâmetro e área do CL de forma isolada não fornecem informação precisa a respeito de sua capacidade funcional, estes parâmetros devem estar associados à vascularização, ecogenicidade e produção de progesterona, como demonstrado em nossos resultados no qual não foi observada diferença das dimensões do CL entre os grupos G1 área ($7,66 \pm 0,36$) e G2 área ($7,41 \pm 0,91$) ($P > 0,05$), diâmetro G1 ($31,53 \pm 1,84$) e G2 ($30,68 \pm 1,82$), ($P > 0,05$). Também foi observada correlação inexistente entre P4 e a área do CL $r = -0,20$

($P < 0,05$) e o diâmetro do CL $r = - 0,28$ ($P < 0,05$) o que sugeri que as dimensões do CL não refletem a concentração de P4.

A taxa de P4 encontrada no G2 ($7,19 \pm 3,49$), seria uma taxa suficiente para a manutenção da gestação, por isso não demonstrou diferença entre os grupos, evidenciando também a interferência de fatores ambientais e de manejo sobre a taxa de prenhez, além do nível de P4.

Havia-se uma perspectiva que o tônus uterino influenciasse na taxa de prenhez, como descrito por McCue et al., (1999) que encontraram uma relação entre tônus uterino bom e excelente com concentração plasmática de progesterona mais alta. Esses dados são reforçados por Alonso, (2007) que descreveu uma maior taxa de prenhez em receptoras com maior tônus, porém, em nosso estudo, não houve diferença ($P < 0,05$), e a correlação existente do tônus com os outros fatores indicadores de prenhez, como P4 $r = 0,25$ ($P > 0,05$), PV CL objetiva $r = 0,29$ ($P > 0,05$), demonstra que este índice é uma subjetiva e individual, não sendo bem exposta em números.

Conclusão

Conclui-se que a PV CL é indicativo de prenhez por refletir a concentração plasmática de P4, sendo a PV CL a melhor análise para seleção de receptoras tendo em vista que a concentração plasmática de P4 tem correlação significativa com a PV CL objetiva e subjetiva e não apresenta correlação significativa com as dimensões do CL e com o Tônus uterino. A avaliação subjetiva é eficaz, sendo um método mais prático e em tempo real para determinar a funcionalidade do CL.

Referências Bibliográficas

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 , Universida de Estadual Paulista**, Botucatu, 2007.

ALZIABI, 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.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.

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.205-206, 2011.

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

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

DHARMARAJAN, A. M.; BRUCE, N. W.; AND MEYER, G. T. Quantitative ultrastructural characteristics relating to transport between luteal cell cytoplasm and blood in the corpus luteum of the pregnant rat. **American Journal of Anatomy**, v. 172, p. 87-99, 1985

GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2. ed, Wisconsin: **Equiservices**, Cross Plains, 640 p, 1992.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O., UTT, M.D., BEG, M.A.. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, 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. **Animal Reproduction Science**. 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. **Reproduction Fertility Dev**, v.20, p.684-693, 2008.

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. **Reproduction Fertility Dev**. 27, 957–968.

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.

LOVE, C.C.; THOMPSON, J.A.; LOWRY, V.K.; VARNER, D.D. 2002. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. **Theriogenology** 57, 1135–1142.

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

MIYAMOTOA, A.; SHIRASUNA, K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B.; WATANABE, S.; HAYASHI, M.; YAMAMOTOA, D.; MATSUI, M.; ACOSTA, T.J. 2005. Bloodflow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. **Domestic Animal Endocrinology** 29, 329–339.

MORTENSEN, C.J.; CHOI, Y.H.; HINRICHS, K.; ING, N.H.; KRAEMER, D.C.; VOGELSANG, S.G.; VOGELSANG, M.M. 2009. Embryo recovery from exercised mares. **Animal Reproduction Science**. 110, 237–244.

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.

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** Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/108506>>, 2013.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**; 51:91–104, 1999.

STOUT, T.A.E. Equine embryo transfer: review of developing potential. **Equine Veterinary Journal**; 38:467–78, 2006.

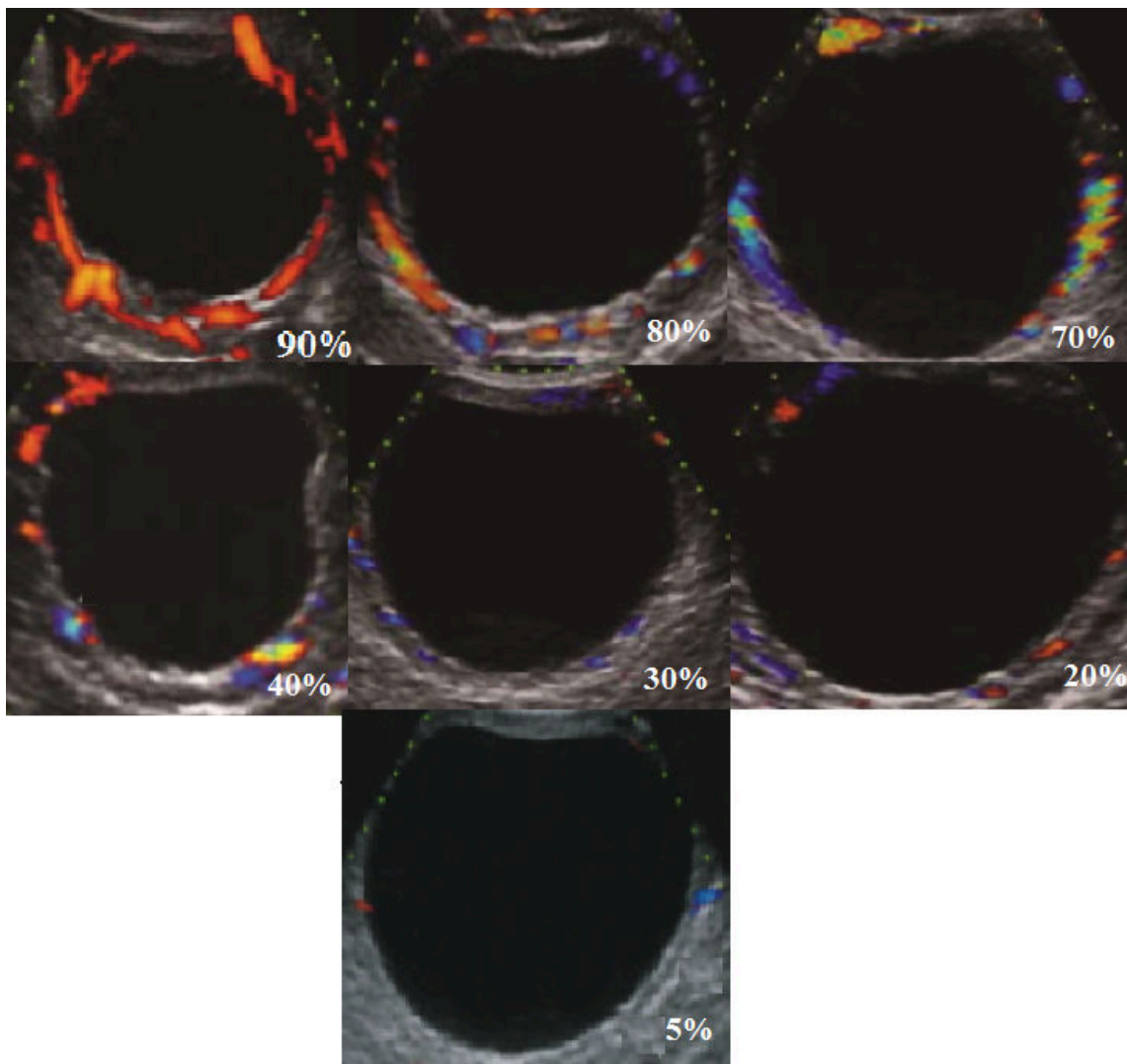
STOUT, T.A.E. Selection and management of the embryo transfer donor. **Pferdeheilkunde**; 6:685–8, 2003.

WILSHER, S.; ALLEN, W.R. Uterine influences on embryogenesis and early placentation in the horse revealed by transfer of day 10 embryos to day 3 recipient mares. **Reproduction**; 137:583–93, 2009.

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.

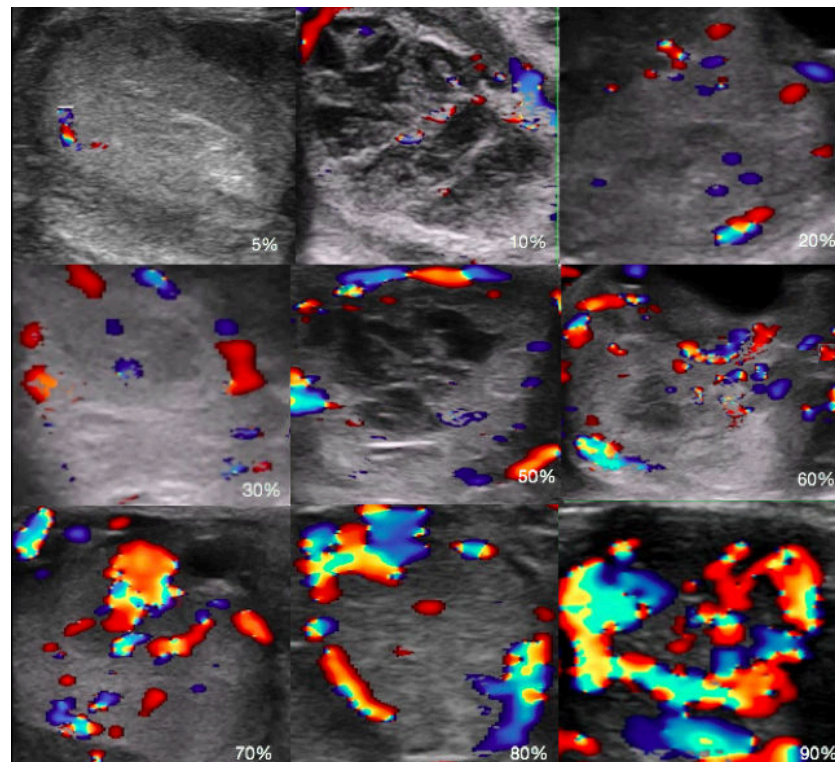
APÉNDICE A

Diagrama para avaliação da perfusão vascular subjetiva da parede folicular observado em um vídeo de um minuto.



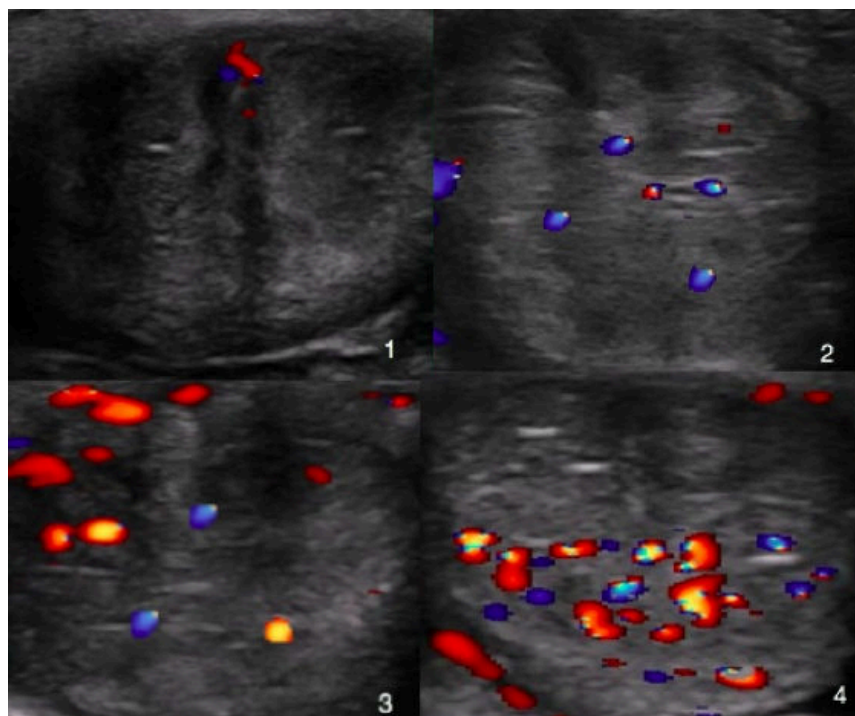
APÉNDICE B

Diagrama para avaliação subjetiva da perfusão vascular no corpo lúteo, em percentual.



APÉNDICE C

Diagrama para avaliação subjetiva da perfusão vascular do endométrio, em escala de 1 a 4.



Homenagem:

À Cidade de Campina Grande, que me acolheu de braços abertos.

Hino de Campina Grande - PB

Venturosa Campina querida,
 Ó cidade que amo e venero!
 O teu povo o progresso expande,
 És na terra o bem que mais quero!
 O teu céu sempre azul cor de anil,
 Tuas serras de verde vestidas
 Salpicadas com o ouro do sol,
 Ou com a hóstia dos brancos luares!

Eterno poema
 De amor à beleza,
 Ó recanto abençoado do Brasil!
 Onde o Cruzeiro do Sul resplandece.
 Capital do trabalho e da paz!

Oficina de ilustres varões,
 Canaã de leais forasteiros,
 És memória de índios valentes.
 E singelos e alegres tropeiros!
 Tua glória revive, Campina,
 Na imagem dos homens audazes,
 Aguerridos heróis de legendas
 Que marcaram as tuas fronteiras!

Eterno poema
 De amor à beleza,
 Ó recanto abençoado do Brasil!
 Onde o Cruzeiro do Sul resplandece,
 Capital do trabalho e da paz!

Letra: Fernando Silveira

Melodia: Antônio Guimarães.

“A tarefa de viver é dura, mas fascinante .”

Primo Suassuna.

*Mas tu, Senhor, és o escudo que me protege,
minha glória e o que me ergue a cabeça.*

Salmos 3:3, 8