

MARIA DO CARMO RODRIGUES DE MEDEIROS

**AVALIAÇÃO POR ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER DO EFEITO DO
EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA EM OVÁRIOS DE ÉGUAS
CÍCLICAS**

RECIFE

2016

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

MARIA DO CARMO RODRIGUES DE MEDEIROS

**AVALIAÇÃO POR ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER DO EFEITO DO
EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA EM OVÁRIOS DE ÉGUAS
CÍCLICAS**

**Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Ciência Veterinária
da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como requisito parcial
para obtenção do grau de MESTRE em
Ciência Veterinária.**

Orientadora:

Aurea Wischral

RECIFE

2016

Ficha catalográfica

M488a Medeiros, Maria do Carmo Rodrigues de
Avaliação por ultrassonografia doppler do efeito do
extrato de pituitária equina em ovários de éguas cíclicas /
Maria do Carmo Rodrigues de Medeiros. – Recife, 2016.
47 f. : il.

Orientadora: Aurea Wischral.
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Medicina Veterinária, Recife, 2016.

Referencias.

1. Equino 2. Folículo ovariano 3. Fluxo sanguíneo
4. Superovulação I. Wischral, Aurea, orientadora II. Título

CDD 636.089

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

**AVALIAÇÃO POR ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER DO EFEITO DO
EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA EM OVÁRIOS DE ÉGUAS
CÍCLICAS**

Dissertação de Mestrado elaborada por

MARIA DO CARMO RODRIGUES DE MEDEIROS

Aprovada em 26/02/2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. AUREA WISCHRAL

Orientadora- Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Prof. Dr. GUSTAVO FERRER CARNEIRO

Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

Prof. Dr. VICTOR NETTO MAIA

Departamento de Medicina Veterinária- UNINASSAU

A Deus

Aos meus pais Maria de Lourdes da Luz Medeiros e Raimundo Rodrigues de Medeiros (*in
memoriam*)

À minha Orientadora Aurea Wischral pelos ensinamentos e transmissão de conhecimentos,
confiança, respeito, oportunidade e apoio.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por atender as minhas orações de realização de mais um sonho.

À minha mãe Maria de Lourdes da Luz de Medeiros e meu irmão José Marciel de Medeiros pela compreensão de minha ausência e incentivo.

À minha Orientadora Prof. Dra. Aurea Wischral pela oportunidade concedida ao bater em sua porta, a qual tem sido um exemplo em minha vida profissional, pela transmissão de conhecimentos, respeito, estando sempre presente em vários momentos.

Ao prof. Dr. Helio Manso e Profa. Dra. Helena Emília Manso pelo apoio em disponibilizar os animais e o laboratório para execução do experimento.

Ao Dr. Adalberto Farinasso pela disponibilidade do hormônio utilizado nesse experimento e conhecimentos transmitidos.

Ao Dr. André Mariano Batista pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro pela colaboração nessa pesquisa.

À Igor Nery pela colaboração, ensinamentos e parceria em todas as etapas do experimento.

À minha querida amiga Karina Rodrigues de Miranda pelo apoio e amizade.

Aos amigos e colaboradores Keite, João, Bruno, Suzana, Helder, Silvinho pela ajuda e aprendizado no manejo com os animais e na realização do trabalhos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco a qual merece o meu respeito, sendo uma grande Instituição de oportunidades profissionais.

À FACEPE pela bolsa de pesquisa.

RESUMO**AVALIAÇÃO POR ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER DO EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE PITUITÁRIA EQUINA EM OVÁRIOS DE ÉGUAS CÍCLICAS**

Com o objetivo de avaliar o efeito do extrato bruto de pituitária equina (EPE), produzido no período de anestro estacional, sobre a superovulação e vascularização folicular e luteal, foram utilizadas seis éguas da raça Puro Sangue Árabe, em dois ciclos estrais (controle e tratamento). As éguas foram sincronizadas utilizando prostaglandina $F_{2\alpha}$, e monitoradas diariamente, por ultrassonografia modo B, até que os folículos atingissem diâmetro de aproximadamente 23 mm (desvio). No ciclo tratamento, a partir do desvio, as éguas receberam 8 mg de EPE, uma vez ao dia, por via IM, até que dois ou mais folículos atingissem diâmetro entre 32 a 35 mm. A ovulação foi induzida com acetato de deslorelina (750 μ g, IM) quando os folículos atingiram no mínimo 35 mm. No momento do desvio folicular, da indução da ovulação e do último exame pré-ovulatório foi utilizada a ultrassonografia modo B para medir o diâmetro dos folículos e a área do corpo lúteo no oitavo dia pós-ovulação; também foi usado Doppler colorido para avaliar a perfusão sanguínea da parede folicular e do parênquima luteal, em todos os momentos. No ciclo controle foi realizado o mesmo procedimento exceto pelo uso do EPE. Não foi observado efeito do EPE sobre número de ovulações, diâmetro dos folículos, vascularização da parede folicular e concentração sérica de estrógeno. Os animais tratados ou não, apresentaram CLs funcionais conforme a concentração sérica de progesterona, não havendo diferença na área do parênquima ou vascularização luteal, nem na concentração de progesterona, no oitavo dia após a ovulação. Foi observado que o EPE proporcionou um maior número de folículos subordinados no momento da indução da ovulação do folículo dominante. Embora estes folículos não tenham chegado a ovular, concluiu-se que o EPE atuou no crescimento de folículos, que podem ser utilizados em outras biotécnicas como aspiração folicular, com maior aproveitamento da reserva folicular de ovários equinos.

Palavras-chave: Equino, Folículo ovariano, fluxo sanguíneo, superovulação.

ABSTRACT

DOPPLER ULTRASOUND EVALUATION OF THE CRUDE EXTRACT EQUINE PITUITARY EFFECT ON CYCLIC MARES OVARY

Aiming to evaluate the effect of crude equine pituitary extract (EPE), obtained during anestrus, on superovulation, and follicular and luteal vascularity, it was used six purebred Arabian mares in two estrous cycles (control and treatment). Mares were synchronized using prostaglandin F_{2α}, and monitored daily by ultrasound B mode until the follicles reached diameter close to 23 mm (deviation). In this moment, mares in the treatment cycle received 8 mg of EPE, once a day, intramuscularly, until two or more follicles reached a diameter between 32 and 35 mm. Ovulation was induced with deslorelin acetate (750 mcg, MI) when follicles reached at least 35 mm. At the time of follicular deviation, induction of ovulation and final preovulatory exam, it was used B-mode ultrasound to measure the diameter of follicles, and, on the eighth day after ovulation, to measure the area of the corpus luteum (CL); color Doppler was also used to assess blood perfusion of the follicle wall and luteal parenchyma. In the control cycle was performed the same procedure except for the use of EPE. There was no effect of EPE on ovulation number, diameter of follicles, vascularity of the follicular wall and serum estrogen concentration. Animals treated or not, showed functional CLs, with no difference in parenchymal area or luteal vascularization, or in serum progesterone concentration on the eighth day after ovulation. It was observed that the EPE provided a greater number of subordinate follicles at the time of induction of ovulation of the dominant follicle. Although these follicles have failed to ovulate, it was concluded that EPE influenced the follicles growth, and it can be used in other biotechnologies, with greater utilization of equine ovarian follicular reserve.

Key words: Equine, ovarian follicle, blood flow, superovulation

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

	Pág.
Revisão Bibliográfica	
Figura 1- Variação hormonal durante o ciclo estral em égua. (Adaptado de Brinsko et al., Manual of equine Reproduction, 3 ed, Missouri, 2011).	14
Artigo Científico	
Figura 1 – Imagens ultrassonográfica em Doppler colorido de folículo (A) e de corpo lúteo (B), para análise de perfusão em éguas.	37
Figura 2- Média e erro padrão da média do diâmetro (mm) folicular no momento do desvio, no dia da indução da ovulação e pré-ovulação dos grupos controle e tratamento com EPE.	40
Figura 3- Média e erro padrão da média do percentual de vascularização folicular no momento do desvio, no dia da indução da ovulação e pré-ovulação dos grupos controle e tratamento com EPE.	40
Figura 4- Imagem de embriões colhidos de égua tratada com EPE (A) e controle (B), corados com Hoescht 33342 e Iodeto de Propídeo.	43

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Média e desvio padrão dos níveis de estrógeno (E ₂) circulante, diâmetro (Ø) e percentual (%) de vascularização do folículo dominante e número (N) total de folículos e ovulações em éguas tratadas com EPE.	39
Tabela 2 - Média e desvio padrão dos níveis de progesterona (P ₄) circulante, área luteal total (cm ²) e percentual (%) de vascularização do corpo lúteo, 8 dias após a ovulação, em éguas tratadas com EPE.	44

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Dinâmica Folicular em Égua	13
2.2 Superovulação em Égua	15
2.3 Corpo Lúteo	17
2.4 Avaliação Ultrassonográfica modo B na Dinâmica Ovariana na Égua	19
2.5 Ultrassonografia Doppler na Reprodução Equina	20
2.6 Avaliação Folicular por Ultrassonnografia Doppler	21
2.7 Avaliação da Vascularização do Corpo Lúteo com Uso de Ultrassom Doppler Colorido	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
5. ARTIGO CIENTÍFICO	32

1 INTRODUÇÃO

As fêmeas equinas são poliéstricas estacionais monovulatórias. Normalmente ocorrem duas grandes ondas foliculares durante o ciclo, em que muitos folículos iniciam o processo de maturação mas, geralmente, só um se torna dominante e ovula (BRINSKO et al., 2011) formando o corpo lúteo (CL) e aumentando a secreção de progesterona (MOURA, 2012).

Uma forma de aumentar a taxa de recuperação embrionária na espécie equina tem sido a superovulação, em que muitos protocolos hormonais já foram utilizados, mas sem obtenção de sucesso. Todavia, o extrato de pituitária equina (EPE) tem sido consideravelmente utilizado, principalmente em nível experimental (PIMENTEL e CARNEIRO, 2008).

A superovulação de éguas com uso de EPE, em doses e frequência variadas, tem aumentado significativamente o número de ovulações e com isso a obtenção de mais de um embrião por ciclo (SCOGGIN et al., 2002; SQUIRES e McCUE, 2007; ROCHA FILHO, 2005; DIPPET et al., 1994). O tratamento com EPE, em dose diária menor, tem sido eficiente para induzir múltiplas ovulações em éguas cíclicas (FARINASSO, 2004), e também é utilizado como indutor de ovulação de animais em transição (BARROS, 2015).

O tratamento com hormônios gonadotróficos para indução de superovulação, em éguas, está associado com o aumento da perfusão ovariana, favorecendo o desenvolvimento de múltiplos folículos e o aumento dos níveis de estrógeno. Supostamente, o aumento do fluxo sanguíneo está relacionado com a resposta à estimulação ovariana (WITT et al., 2012). As principais alterações na hemodinâmica que estão envolvidas com a remodelação de tecido ovariano cíclico ocorrem durante a fase final de crescimento folicular, ovulação e formação do corpo lúteo (ACOSTA et al., 2003).

Nos últimos anos, o fluxo sanguíneo local do ovário tem sido analisado por meio da ultrassonografia com Doppler, permitindo analisar individualmente os folículos (AYRES e MINGOTI, 2012) e avaliar as mudanças na hemodinâmica ovariana (FERREIRA, 2013). Já foi observado que o desvio do diâmetro entre os folículos dominantes e subordinados está associado com fluxo sanguíneo que mantém, em quantidades satisfatórias, hormônios e nutrientes para o desenvolvimento de folículos ovulatórios (GURGEL et al., 2008).

A reprodução assistida na espécie equina é de relevância para aumentar a eficiência reprodutiva (PIMENTEL e CARNEIRO, 2008). Os trabalhos recentes realizados na reprodução de éguas mostram a importância da indução da ovulação, bem como a superovulação, para coleta de embrião em doadoras, e para isso os indutores de ovulação têm sido associados a

monitoramento por meio de ultrassonografia. No entanto, o monitoramento com ultrassonografia Doppler tem sido pouco utilizado em associação com a superovulação, em relação à análise da vascularização folicular e luteal.

Assim, é importante estudar os efeitos do tratamento de superovulação com EPE na dinâmica e vascularização folicular de éguas cíclicas, a fim de melhor entender seus resultados na produção de embriões nesta espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DINÂMICA FOLICULAR EM ÉGUA

Os folículos primordiais formados durante a vida fetal ou logo após o nascimento constituem a reserva ovariana e poderão crescer até a ovulação ou degenerar durante a vida reprodutiva da fêmea (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Durante a estação de monta, as éguas não prenhes apresentam estros recorrentes com duração média do ciclo de 21 a 22 dias. O comprimento de diestro ou fase luteal é relativamente constante, de quatorze a quinze dias, e o estro ou fase folicular é variável de dois a doze dias, com maior duração na época da reprodução, talvez como resultado de uma menor quantidade de hormônio luteinizante (LH) que surge nesse período. Éguas tendem a apresentar uma ou duas ondas foliculares durante o ciclo estral, sendo mais comum apenas uma onda. Os folículos destinados a ovular tendem a crescer cerca de três a cinco milímetros de diâmetro por dia, iniciando cerca de sete dias antes da ovulação, com correspondente atresia de outros folículos na mesma onda folicular (BRINSKO et al., 2011) (Fig. 1).

O folículo ovulatório é bem identificado pelo uso do ultrassom cerca de dez a doze dias antes da ovulação (BRINSKO et al., 2011). As ondas foliculares, ovulatória ou anovulatória, são estimuladas por uma onda de hormônio folículo estimulante (FSH), que atinge um pico quando o maior folículo tem cerca de 13 mm. Na ocorrência da emergência de uma onda folicular ovulatória, os folículos se desenvolvem em uma fase de crescimento comum até o início do desvio em que o folículo dominante continua a crescer e os folículos subordinados começam a regredir. O desvio começa quando o futuro folículo dominante apresenta cerca de 22,5 mm, sendo que a capacidade para a dominância é semelhante entre os quatro maiores folículos, no início do desvio (GINTHER et al., 2004). Vários fatores estão relacionados com o desvio folicular, incluindo o sistema do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), peptídeos, receptores de gonadotrofinas, fatores angiogênicos e esteróides (GURGEL et al., 2008).

O declínio inicial na onda de FSH parece ser uma função da inibina. As concentrações intrafoliculares de estradiol, IGF-1, inibina A e activina apresentam aumento no futuro folículo dominante em relação aos folículos subordinados, cerca de um dia antes do início do desvio (GINTHER, et al., 2004).

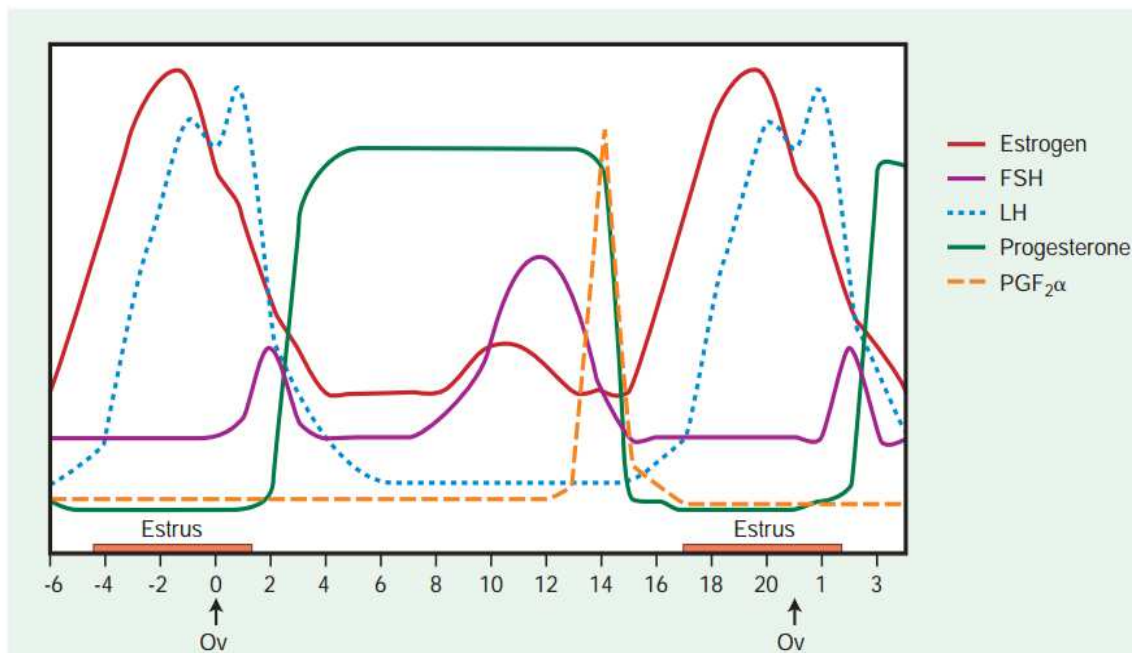


Figura 1- Variação hormonal durante o ciclo estral em égua. (Adaptado de Brinsko et al., Manual of equine Reproduction, 3 ed, Missouri, 2011).

A dominância folicular é caracterizada por um crescimento contínuo do maior folículo para torná-lo dominante e reduzir o crescimento dos folículos restantes para torná-los subordinados. A diferença entre os dois maiores folículos, no início do desvio, ocorre em 24 horas na égua, sendo o tempo necessário para organizar o processo do desvio antes do segundo maior folículo atingir diâmetro semelhante. Durante esse tempo, o maior folículo se encarrega de suprimir as concentrações circulantes de FSH para as exigências dos menores, provocando sua regressão. O folículo maior melhora sua capacidade de suprimir o FSH bem como utiliza reduzidas concentrações de FSH para o seu crescimento continuado (GINTHER, 2000).

O folículo de maior tamanho é responsável pela maior quantidade de estrógeno secretado pelo ovário, durante o cio, que decresce durante o pico de hormônio luteinizante (LH). A produção de estradiol determina qual folículo obterá um número de receptores para LH necessário à ovulação e luteinização. O folículo destinado à ovulação também recebe maior volume de sangue (ml/min.) (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O estradiol e inibina contribuem para o declínio de FSH, com isso, apenas o maior folículo é capaz de utilizar a baixa concentração de FSH, estabelecendo a seleção (GINTHER et al., 2001). No início do desvio, os folículos apresentam diâmetro inferior a 20 mm e produção de

estradiol em ondas que levam ao desenvolvimento de múltiplos folículos ovulatórios (GINTHER et al., 2009).

A concentração elevada de hormônio LH circulante pode desempenhar papel contínuo no desenvolvimento do folículo maior, porém não está claro se o LH começa a ser utilizado pelo folículo maior antes, durante ou após o início do desvio do diâmetro (GINTHER, 2000).

O aumento da concentração sérica de LH, antes do desvio, influencia a produção de estradiol pelo futuro folículo dominante (BERGFELT et al., 2001). Ginther et al. (2006), ao estudarem o ciclo estral de éguas pôneis, constataram que o estradiol atinge seu pico no período pré-ovulatório dois dias antes da ovulação ocorrer. O estradiol do fluido folicular exerce feedback negativo sobre o LH no momento da ovulação (GINTHER et al., 2008).

Folículos dominantes anovulatórios podem ocorrer em consequência da deficiência de LH durante o desenvolvimento inicial do folículo. Entretanto, concentrações de FSH em folículos de 30 mm foram maiores nos folículos que se tornaram anovulatórios do que naqueles que ovularam, indicando uma deficiência da supressão de FSH. Por outro lado, as concentrações de estradiol, IGF-I, inibina A e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) no líquido folicular de folículos anovulatórios de 30 mm foram menores do que dos folículos ovulatórios de mesmo tamanho (ACOSTA et al., 2004).

2.2 SUPEROVULAÇÃO EM ÉGUA

A superovulação pode ser utilizada com finalidade de aumentar a recuperação embrionária e proporcionar embriões extras para congelamento. Alguns protocolos de superovulação foram utilizados, na espécie equina, para obtenção de múltiplas ovulações, sem muito ou quase nenhum sucesso. Em trabalhos experimentais, foram administrados gonadotrofina coriônica equina (eCG), hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), imunização contra inibina, FSH de origem suína e o extrato de pituitária equina (EPE), sendo EPE o mais utilizado (PIMENTEL e CARNEIRO, 2008). O uso de gonadotrofina coriônica equina (eCG), GnRH e vacina contra inibina apresentaram sucesso limitado ao estímulo de ovulação múltipla (SQUIRES e MCCUE, 2007).

Na indução da ovulação de éguas em anestro estacional, com hormônio folículo estimulante recombinante equino (reFSH) (0,65 mg) durante 15 dias, obteve-se ovulação em 77% das éguas dentro de 72 horas após administração de hCG (MEYRS-BROWN et al., 2013). Já o tratamento com hormônio folículo estimulante recombinante humano (rhFSH) (450 UI),

em éguas que apresentavam folículos entre 10 a 25 mm, não mostrou diferença significativa no desenvolvimento folicular, na taxa de ovulação, bem como no número de recuperação embrionária em relação a éguas não tratadas. Embora o tratamento não tenha induzido o aumento no número de ovulação dos folículos maiores de 25 mm, houve maior número de pequenos folículos disponíveis no início do tratamento. No entanto, as doses de 450 e 900 UI foram ineficazes para estimular o desenvolvimento folicular múltiplo na égua (THARASANIT et al., 2006).

A preparação padronizada de Extrato de Pituitária Equina (EPE) purificado em eFSH também resulta em uma resposta semelhante à EPE bruto, contudo, potenciais problemas após as injeções de eFSH incluem folículos anovulatórios ou luteinizados (SQUIRES e MCCUE, 2007). Entretanto, o EPE tem sido utilizado em éguas resultando em aumento do número de ovulações (ROCHA FILHO, 2005; DIPPERT et al., 1994).

A quantidade de FSH presente no EPE não afeta a resposta superovulatória de éguas, pois o número de ovulações por égua não diferiu entre aquelas que receberam tratamento com fração enriquecida de FSH (feFSH) ou EPE (ROSAS et al., 1998).

Scoggin et al. (2002), tratando dez éguas com EPE, verificaram que a dose de 50 mg, uma vez ao dia, resultou em maior número de folículos pré-ovulatórios do que os tratamentos com 25 mg, uma vez ao dia, 12,5 mg, duas vezes ao dia, ou 25 mg duas vezes ao dia. Contudo, o número de ovulações foi maior nas éguas que receberam 25 mg de EPE duas vezes por dia comparadas aquelas que receberam 25 mg uma vez ao dia ou 12,5 mg duas vezes ao dia. Já a recuperação embrionária foi maior em éguas que receberam 12,5 mg de EPE duas vezes ao dia do que aquelas que receberam 25 mg uma vez ao dia. Todavia, 100% das éguas tratadas com EPE na dose de 50 mg uma vez ao dia obtiveram, pelo menos, duas ovulações. De acordo com Squires e Mccue (2007), estudos têm mostrado que a injeção de EPE resulta em três a quatro ovulações por ciclo com obtenção de dois embriões.

Dippert et al. (1994), avaliando a taxa de fertilização de oócitos recuperados em ovulações de éguas superovuladas com EPE, na dose de 40 mg, obtiveram 88% de oócitos fertilizados enquanto o grupo controle apresentou 91%. Os oócitos recuperados e fertilizados que evoluíram para embriões em estágio de mórula ou blastocisto inicial das éguas tratadas com EPE e do grupo controle foram, respectivamente, 46,4% e 40,0%. Embora a taxa de recuperação de embriões tenha sido menor que o esperado, as taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário foram semelhantes entre éguas superovuladas e controle.

O número médio de ovulações obtido entre o tratamento com EPE e seu respectivo controle foi similar, no entanto, o número médio de embriões recuperados tendeu a ser maior no ciclo não tratado. O tratamento com eFSH provocou maior incidência de múltiplas ovulações e maior número médio de ovulações em relação ao grupo controle. Os tratamentos com baixas doses de EPE ou eFSH não interferem no desenvolvimento do maior folículo, mas prolonga a fase de crescimento do segundo maior (ROCHA FILHO, 2005).

Já o tratamento com EPE (25 mg) com ou sem associação ao hCG (2500), 7 dias após ovulação espontânea, contribuiu significativamente para o aumento do número de folículos disponíveis. Nesse estudo, a proporção de folículos apresentando entre 22-30 mm variou de 63,5% a 73,8%, que foram aspirados obtendo uma taxa de recuperação de oócitos variando entre 15 a 16,7%. A proporção de éguas que produziu, pelo menos, um oócito foi de 70% no EPE associado ao hCG, 60% no EPE sozinho e 50% no grupo controle. Os autores concluíram que o tratamento com EPE e hCG apresentou uma maior proporção de folículos com células da granulosa expandida (64,4%) em relação ao controle (3,3%) e ao tratamento com EPE (25%) (BLANCO et al., 2009).

O tratamento superovulatório de éguas com eFSH não apresentou resultados diferentes estatisticamente quando comparado ao grupo controle, em virtude de haver um ou dois folículos em desenvolvimento durante o período de avaliação. Contudo, houve um maior fluxo sanguíneo ovariano nos ciclos tratados com eFSH em éguas com mais de dois folículos (WITT et al., 2012).

2.3 CORPO LÚTEO (CL)

O corpo lúteo é considerado uma glândula transitória ovariana desenvolvida a partir da ovulação, responsável pelo controle do ciclo estral e em algumas fêmeas pela manutenção da gestação. Sua formação depende de fatores mitogênicos, angiogênicos e de crescimento, bem como sua luteólise depende da liberação pulsátil de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio (SALLES e ARAÚJO, 2010).

A gênese do corpo lúteo é desencadeada logo após o colapso do folículo ovulatório, em que sua parede interna desdobra-se em pregas que podem ser visualizadas macroscopicamente e microscopicamente. A constituição das pregas consiste em uma porção central de estroma e de grandes vasos venosos. Logo após a ovulação, cerca de 24 horas, as células da teca entram

em degeneração. No período inicial do desenvolvimento do corpo lúteo há um aumento significativo e rápido de seu peso (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

A angiogênese desempenha um papel relevante no crescimento e regressão do corpo lúteo, influenciando sua vascularização e controlando a sua vida útil (AL-ZI' ABI et al., 2003)

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) parece ser um dos principais fatores angiogênicos responsáveis pelo desenvolvimento da vascularização do corpo lúteo (REYNOLDS et al., 2000). O VEGF estimula a produção de PGE_2 e P_4 , que são cruciais para o estabelecimento do corpo lúteo, e tem sido identificado como o principal fator de crescimento angiogênico produzido pelo CL (GALVÃO et al., 2012)

O índice de proliferação de células endoteliais é intenso no início da fase luteal, e tanto nessa fase quanto no decorrer de seu desenvolvimento, há uma densa rede de capilares, regredindo 14 dias pós ovulação (AL-ZI' ABI et al., 2003).

A função primária do corpo lúteo é a secreção de progesterona. O LH é relevante para o desenvolvimento normal e função luteal, sendo responsável por estimular células luteínicas a secretar progesterona por meio da ativação da proteína quinase A (NISWENDER et al., 2000).

A progesterona é um hormônio secretado pelas células luteínicas na forma de grânulos, também pela placenta e glândulas adrenais. Atua sinergicamente com estrógeno para promoção do cio, prepara o endométrio para implantação do embrião e manutenção da prenhez, inibe a motilidade uterina e, quando em níveis elevados, promove a inibição do cio e LH, auxiliando no desenvolvimento do tecido secretor da glândula mamária (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

A hipertrofia e luteinização das células da granulosa começam 10 horas após a ovulação (VAN NIEKERK CH et al., 1975). BAO (2008,) ao avaliar as células lúteas de ratos, verificou que o fator ativador de plaquetas (PAF) regula a síntese de progesterona e expressão do mRNA de VEGF em células luteínicas para mediar a formação de corpo lúteo ovariano. Segundo Ginther (2006), logo após à ovulação ocorrer, há um aumento no nível de progesterona sérica, atingindo o máximo no sexto dia. A concentração de progesterona no plasma está intimamente ligada com as alterações que ocorrem no corpo lúteo (VAN NIEKERK et al., 1975).

Mann (2009), comparando o tamanho do corpo lúteo e a concentração de progesterona circulante em vacas, verificou que o tamanho do corpo lúteo e a concentração de progesterona sérica aumentaram nos dias cinco e oito após ovulação, mostrando que há uma estreita relação entre o desenvolvimento do CL e aumento da concentração de P_4 no início da fase luteal. Kanitz et al (2007), analisando a concentração de progesterona em éguas tratadas com GnRH, observaram que a média da concentração de progesterona aumentou continuamente do dia zero

ao dia oito após ovulação, tanto no grupo tratado quanto no grupo controle. Quanto às concentrações de progesterona a partir do dia nove ao dia onze não diferiram entre o grupo que recebeu GnRH e o grupo controle.

Ginther et al. (2007a), ao estudar a concentração plasmática de progesterona na fase luteal de 20 éguas cíclicas, verificaram concentração máxima no dia oito após ovulação e que houve uma diminuição abrupta entre os dias quinze e dezessete após ovulação, definindo este período como luteolítico. Vanderwall et al. (1993), avaliando os níveis plasmáticos de progesterona nos dias 10 e 15 do primeiro ciclo ovulatório, verificaram maior concentração do hormônio em éguas de idade avançada em relação às éguas jovens. Ferraz et al. (2001), ao analisarem a concentração de progesterona em éguas da raça PSI, verificaram valores maiores no início da gestação em éguas virgens em relação às paridas.

2.4 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA MODO B NA DINÂMICA OVARIANA NA ÉGUA

O exame ultrassonográfico no ovário da égua é indicado para avaliar a atividade ovariana, estimar a fase do ciclo estral, monitorar a dinâmica folicular, prever ovulação, detectar dupla ovulação ou falha na ovulação (MIRO, 2012). Os folículos ovarianos antrais são estruturas vesiculares aparecendo na imagem ultrassonográfica com uma forma arredondada anecóica (MOURA e MERKT, 1996).

A avaliação ultrassonográfica dos ovários de uma égua durante o período pré-ovulatório garante a determinação exata do número, localização, tamanho e forma dos folículos ovarianos. O diâmetro dos folículos pré-ovulatórios podem variar entre 40 a 50 mm, porém o diâmetro pode ser menor nos casos de haver dois folículos pré-ovulatórios no mesmo ovário. Em torno de 24h antes da ovulação, a maioria dos folículos tende a mudar da forma esférica para a cônica ou de pêra e a parede pode apresentar aparência recortada ou engrossada. A ecogenicidade do fluido folicular aumenta ligeiramente antes da ovulação ocorrer. Exames ultrassonográficos, realizados a intervalos de uma hora, demonstraram o serrilhamento da granulosa e amolecimento do folículo entre 1 a 8 horas antes da ovulação em 100% dos folículos avaliados (BRINSKO et al., 2011).

Gastal et al. (1998), avaliando folículos pré-ovulatórios, no início da estação de monta, observaram o aparecimento de uma camada anecóica subjacente à camada da granulosa. Nesse mesmo estudo, constataram que 70% desses folículos apresentavam ecotextura máxima tanto para camada da granulosa quanto para camada anecóica um dia antes à ovulação. Correlacionaram ainda a ovulação com o diâmetro folicular individual e verificaram ser ineficaz para prever a ovulação, porque os diâmetros podem variar no dia anterior a ovulação entre 31 e 49 mm.

A ecotextura da parede folicular está associada com o desvio em diâmetro de folículos. Em éguas pôneis, foram obtidos valores crescentes na ecotextura da camada da granulosa (espessura e ecogenicidade) em relação ao crescimento dos folículos, enquanto que os valores crescentes para a camada anecóica foram mais característicos de um futuro folículo dominante. O desenvolvimento da camada anecóica abaixo da granulosa distingue o futuro folículo dominante do secundário, antes do início do desvio de diâmetro (GASTAL et al., 1999).

Quando dois folículos se apresentam pré-ovulatórios e a parede fina entre os dois for difícil de visualizar na ultrassonografia, podem ser confundidos com um único folículo, no entanto, a ovulação dupla é raramente sincrônica, podendo ocorrer com horas ou dias de intervalo (MIRO, 2012).

2.5 ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER NA REPRODUÇÃO EQUINA

A ultrassonografia color Doppler é uma tecnologia baseada na frequência ultrassonográfica que muda com o movimento das células sanguíneas. O ângulo do cursor pode ser usado para representar o ângulo de intersecção de brilho com a direção do fluxo sanguíneo, e a perfusão vascular de uma estrutura pode ser quantificada pelo número de pixels de cor de uma imagem ou pode subjetivamente ser estimada pela extensão de áreas coloridas (Ginther e Utt, 2004).

A avaliação modo Doppler da função ovariana e uterina de éguas auxilia na seleção de animais para receber embriões em programas de transferência, considerando a relação da vascularização luteal com os níveis séricos de progesterona (FERREIRA e MEIRA, 2011). A ultrassonografia Doppler é uma tecnologia emergente com o potencial de aumentar o

diagnóstico, monitoramento e estudo da fisiopatologia reprodutiva equina (GINTHER e UTT, 2004).

O ultrassom modo Doppler, nos últimos anos, vem sendo utilizado na reprodução equina para avaliar o fluxo sanguíneo das artérias uterina e ovariana (WITT et al., 2012; BOLLWEIN et al., 2002) e de folículos e corpo lúteo (GASTAL et al., 2006; GINTHER et al., 2007a; GINTHER et al., 2007 b).

2.6 AVALIAÇÃO FOLICULAR POR ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER

Os sinais de fluxo de sangue no interior do tecido são gerados pelo movimento de sangue, em arteríolas, não sendo possível determinar com maior eficiência os sinais de vênulas (GINTHER et al., 2007b). A diferença no fluxo de sangue na parede folicular entre o folículo dominante e o subordinado ocorre um a dois dias antes do desvio de diâmetro, durante a seleção folicular na égua, em que há um aumento continuado na vascularização do futuro folículo dominante, mas não nos futuros folículos subordinados (ACOSTA et al., 2004).

A adequada formação da rede vascular é um fator limitante para o bom funcionamento do ovário, por disponibilizar oxigênio, nutrientes, substratos e hormônios para células-alvo (AYRES e MINGOTI, 2012).

Na avaliação com Doppler, doze a 36 horas antes da ovulação, a camada granulosa folicular apresentou aumento significativo de pontos coloridos após uso de gonadotrofina coriônica humana (hCG) (GASTAL et al, 2006).

Altermatt et al. (2012) analisaram, com uso de ultrassom Doppler colorido, os efeitos de gonadotrofinas (eLH, eFSH) no fluxo sanguíneo ovariano e folicular de éguas de diferentes idades, verificando maior vascularização nos folículos de éguas idosas em relação a jovens, sem interação significativa entre eFSH ou eLH. O crescimento do folículo dominante não foi associado com a vascularização, embora a idade avançada tendeu a ter um efeito negativo em relação ao crescimento folicular.

Folículos duplos bilaterais não são diferentes dos individuais, contudo, folículos duplos unilaterais mostram um padrão paralelo ao da ovulação simples, mas com menor área de perfusão nos dias cinco, quatro e três antecedentes a ovulação. Todavia, há um aumento na área

de perfusão e da velocidade do fluxo nos dias um e dois antecedentes à ovulação, e diminuição no índice pulsátil que começa no dia 4 antes da ovulação (PALMER et al., 2006).

Segundo Kelley et al.(2014), éguas tratadas com L-arginina 10 dias antecedentes à ovulação, apresentaram um maior crescimento folicular e perfusão vascular do folículo dominante, tendendo a ser maior quatro dias antes da ovulação. Ginther et al. (2007b), utilizando ultrassom Doppler colorido, observou diminuição do fluxo de sangue arterial durante quatro a uma hora antes da ovulação. Folículos pré-ovulatórios podem apresentar baixa perfusão sanguínea mesmo durante a estação reprodutiva (FERREIRA, 2013).

2.7 AVALIAÇÃO DA VASCULARIZAÇÃO DO CORPO LÚTEO COM USO DE ULTRASSOM DOPPLER COLORIDO

A ultrassonografia com Doppler colorido pode avaliar o fluxo sanguíneo do ovário (folículos e corpo lúteo), permitindo um melhor monitoramento da atividade ovariana na égua (MIRO, 2012). Esse método de avaliação do fluxo sanguíneo no corpo lúteo ovariano é de relevância, pois consegue detectar alterações durante o ciclo estral e diferenças individuais na vascularização do mesmo (BOLLWEIN et al., 2002).

O exame do corpo lúteo por meio da ultrassonografia modo-Doppler de éguas receptoras, é uma ferramenta importante, pois auxilia na seleção de animais com perfil sérico de progesterona adequado para o desenvolvimento do embrião e manutenção da gestação (FERREIRA e MEIRA, 2011).

Em bovinos, a avaliação do corpo lúteo resulta em diagnósticos mais precoces e mais acurados de alterações da função luteal no período de reconhecimento materno da gestação (ARÊAS, 2012).

Ginther et al. (2007a), avaliando o fluxo sanguíneo luteal em éguas, verificaram que o percentual máximo de sinais de vascularização do CL ocorreu no dia 10 após ovulação, quando apresentou 77,3% de área luteal com fluxo sanguíneo. Já, Maia (2015), avaliando a vascularização de corpos lúteos de éguas com ovulação natural e induzida por acetato de deslorelina, obteve resultados diferentes em relação ao dia após ovulação, pois verificou que os valores foram superiores nos dias quatro e oito comparados ao dia doze de éguas com ovulação induzida. Contudo, nesse mesmo estudo os resultados não diferiram entre os dias, na ovulação natural.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do Extrato Bruto de Gonadotrofina Equina (EPE), extraído de éguas em anestro estacional, na dinâmica folicular, perfusão sanguínea folicular e do corpo lúteo, e esteroidogênese de éguas criadas em região de clima tropical.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a dinâmica folicular desde a fase do desvio do diâmetro até a pré-ovulatória em éguas tratadas com EPE.
- Avaliar o efeito do tratamento com EPE sobre o percentual de vascularização da parede folicular da fase do desvio até a pré-ovulatória, utilizando ultrassonografia com Doppler colorido.
- Analisar o efeito do tratamento com EPE na concentração de estrógeno circulante na fase de desvio folicular e no momento pré-ovulatório;
- Analisar o efeito do tratamento com EPE sobre a concentração de progesterona circulante e na vascularização do corpo lúteo, oito dias após ovulação.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALTERMATT, J. L.; MAROLF, A. J.; WRIGLEY, R. H.; CARNEVALE, E. M. Effects of FSH and LH on ovarian and follicular blood flow, follicular growth and oocyte developmental competence in Young and old mares. **Animal Reproduction Science**, v.133, n.3-4, p.191-197, 2012.

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

AYRES, H.; MINGOTI, G. Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 3. 2012.

ARÊAS, V.S. **Uso do doppler colorido para avaliação funcional do corpo lúteo em bovinos**. 2012. 80 f. dissertação (mestrado) - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. Alegre.

BAO, S. L. X. Role of platelet-activating factor in progesterone synthesis and vascular endothelial growth factor expreassion in rat luteal cells. **Acta Physiologica Sinica**, v. 60, n. 2, p.275-278, 2008.

BARROS, M. B. S. **Indução de ovulação com acetate de deslorelina e extrato de pituitária equina em éguas cíclicas.** 2015. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

BERGFELT, D. R., GASTAL, E. L., GINTHER, O. J. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 426-432, 2001.

BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; WEBER, F.; STOLLA, R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 43-51, 2002.

BLANCO, I. D.; DEVITO, L. G.; FERREIRA, H. N.; ARAUJO, G. H.; FERNANDES, C. B.; ALVARENGA, M. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Aspiration of equine oocytes from immature follicles after treatment with equine pituitary extract (EPE) alone or in combination with hCG. **Animal Reproduction Science**, v.114, n. 1-3, p. 203-209, 2009.

BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T. I.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D. Reproductive physiology of the nonpregnant mare. In : BRINSKO, S.P.; et al. **Manual of equine reproduction.** 3ª Edição. Missouri: Mosby Elsevier. 2011. p.16-24.

DIPPERT, K. D.; JASKO, D. J.; SEIDEL, G. E.; SQUIRES, E. L. Fertilization rates in superovulated and spontaneously ovulating mares. **Theriogenology**, v.41,n.7, p.1411-1423, 1994.

FARINASSO, A. **Utilização de baixas doses de extrato de pituitária equina na indução de ovulações múltiplas em éguas cíclicas.** 2004. 47f. Dissertação (mestrado em Ciências Agrárias

na área de concentração de Produção Animal)- Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília.

FERRAZ, L. E. S.; VICENTE, W. R. R.; RAMOS, P. R. R. Concentração de progesterona e de estradiol 17- β e características ultrassonográficas da vesícula embrionária no início da gestação em éguas puro sangue inglês. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 4, 2001.

FERREIRA, J. C. Avaliação ultrassonográfica Doppler pré e pós-cobertura do trato reprodutivo de éguas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 108-114, 2013.

FERREIRA, J. C.; MEIRA, C. Aplicação da ultrassonografia colorida doppler em programas de transferência de embriões equinos. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1063-1069, 2011.

GALVÃO, A.; HENRIQUES, S.; PESTKA, D.; LUKASIK, K.; SKARZYNSKI, D.; MATEUS, L. M.; FERREIRA-DIAS, G. M. L. Equine luteal function regulation may depend on the interaction between cytokines and vascular endothelial growth factor: an in vitro study, **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 6, p.1-9, 2012.

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.; 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 estradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. **Reproduction Research**, v.131. p. 699-709, 2006.

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.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 638-647, 2001.

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

GINTHER, O. J.; JACOB, J. C.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; BEG, M. A. Development of one vs multiple ovulatory follicles and associated systemic hormone concentrations in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 441-449, 2009.

GINTHER, O. J., GASTAL, E. L.; RODRIGUES, B. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A . Follicle diameters and hormone concentrations in the development of single versus double ovulations in mares. **Science Direct**, v. 69, p. 583-590, 2008.

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, n. 1, p. 20-27, 2007b.

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, 2007 a.

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-I on follicular fluid factors and follicle dominance in mares. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1063-1069, 2004.

GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler Ultrasound in equine Reproduction: Principles, Techniques, and Potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24, n.12, 2004.

GINTHER, O. J.; UTT, M. D.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradio/LH in mares, **Animal reproduction Science**, v. 95, p.144-150, 2006.

GURGEL, J. R. C.; VIANA, C. H. C.; PEREZ, E. G. A.; NICHI, M. Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafoliculares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, 2008.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ª Edição. Barueri: Manole, 2004, p.36-82.

KANITZ, W.; SCHNEIDER, F.; HOPPEN, H. O.; UNGER, C.; NUMBERG, G.; BECKER, F. Pregnancy rates, LH and progesterone concentrations in mares treated with a GnRH agonist, **Animal reproduction Science**, v. 97, n. 1-2, p. 55-62, 2007.

KELLEY, D.; LEBLANC, M. M.; WARREN, L. K; MORTENSEN, C. J. Influence of arginine supplementation on reproductive blood flow and embryo. **Theriogenology**, v.81, p.752-757, 2014.

MAIA, N.V. **Avaliação da vascularização e da angiogênese de corpos lúteos de éguas com ovulação natural e induzida por acetato de deslorelina**. 2015. 67 f. Tese (doutorado em Ciência Animal Tropical)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MANN, G. E. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows, **Animal reproduction Science**, v. 115, n.1-4, p.296-299, 2009.

MEYRES-BROWN, G. A.; MCCUE, P. M.; TROEDSSON, M. H. T.; KLEIN, C.; ZENT, W.; FERRIS, R. A.; LINDHOLM, A. R. G.; SCOFIELD, D. B.; CLAES, A. N.; MORGANTI, M.; COLGIN, M. A.; WETZEL, R. L.; PETERS, A. R.; ROSER, J. F. Induction of ovulation in seasonally anestrous mares under ambiente lights using recombinante quine FSH (reFSH). **Theriogenology**, v.80, n.5, p.456-462, 2013.

MIRO, J. Ovarian ultrasonography in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 30-33, 2012.

MOURA, J. C. A. Diagnóstico por imagem na reprodução equina “controle do útero”. **Ciência Animal**, v22, n 1, p.161-170, 2012.

MOURA, J.C. A; MERKT, H. **A ultra-sonografia na reprodução eqüina**. 2 Edição. Salvador: Editora Universitária Americana, 1996. 81f.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; McINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p.1-29, 2000.

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. 182-185, 2006.

PIMENTEL, C. A.; CARNEIRO, G. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução de equinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas: aplicadas à reprodução animal**. 2ª Ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 145-159.

ROCHA FILHO, A. N. **Efeito do tratamento com baixa dose de estrato de pituitária ou FSH purificado equino no crescimento folicular, taxa de ovulação e recuperação embrionária em éguas**. 2005.64f. Dissertação (mestrado em reprodução animal)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

ROSAS, C. A.; ALBERIO, R. H.; BARAÑAO, J. L.; AGUERO, A.; CHAVES, M. G. Evaluation of two treatments in superovulation of mares. **Theriogenology**, v.49, n.7, p.1257-1269, 1998.

REYNOLDS, L. P.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the corpus luteum, **Endocrine**, v. 12, n. 1, p.1-9, 2000.

SALLES, M. G. F.; ARAÚJO, A. A. Corpo lúteo gestacional: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 3, p.185-194, 2010.

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, n.1, p.151-164, 2002.

SQUIRES, E. L.; MCCUE, P. M. Superovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 1-8, 2007.

WITT, M. C.; BOLLWEIN, H.; PROBST, J.; BAACKMANN, C.; SQUIRES, E. L.; SIEME, H. Doppler sonography of the uterine and ovarian arteries during a superovulatory program in horses. **Theriogenology**, v. 77, n. 7, 2012.

THARASANIT, T.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; STOUT, T. A. E. Effects of recombinant human follicle stimulating hormone on follicle development and ovulation in the mare. **Theriogenology**, v.65, n.6, p.1071-1081, 2006.

VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L.; FREEMAN, D. A.; WEBER, J. A.; ROCK, R. W.; TESTER, D. F. Ovarian follicles, ovulations and progesterone concentrations in aged versus Young mares, **Theriogenology**, v. 40, n.1, p.21-32, 1993.

VAN NIEKERK, C. H.; MORGENTHAL, J. C.; GERNEKE, W. H.; Relationship between the morphology of and progesterone production by the corpus luteum of the mare, **Journal of reproduction and fertility supplement**, v. 23, p. 171-175, 1975.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Estudo da vascularização folicular e do corpo lúteo de éguas cíclicas tratadas com Extrato de Pituitária Equina utilizando ultrassom Doppler colorido

Study of follicular and corpus luteum vascularization in mares treated with Equine Pituitary Extract using ultrasound color Doppler

Maria do Carmo Rodrigues de Medeiros^{1*}, Adalberto Farinasso², Igor Henrique de Azevedo Valença Nery¹, Helder Melo de Souza¹, João Luís de Albuquerque Vasconcelos³, Keity Laiane Gomes Trindade³, André Mariano Batista¹, Helio Cordeiro Manso Filho³, Gustavo Ferrer Carneiro⁴, Aurea Wischral¹.

RESUMO

O estudo da foliculogênese de éguas é essencial para melhoria da eficiência reprodutiva nessa espécie, e para isso o uso da ultrassonografia com Doppler colorido tem possibilitado uma melhor compreensão da fisiologia ovariana. Todavia, informações sobre vascularização da parede folicular e corpo lúteo são escassas, principalmente quando associado à superovulação. Com o objetivo de avaliar o efeito superovulatório do extrato de pituitária equina (EPE) no fluxo sanguíneo folicular e luteal, o experimento foi realizado utilizando seis éguas da raça Puro Sangue Árabe, em dois ciclos estrais (controle e tratamento). As éguas foram submetidas à sincronização, utilizando prostaglandina F_{2α}, e monitoradas diariamente por ultrassonografia modo B, até que os folículos atingissem diâmetro de 23 mm (desvio). No ciclo tratamento, a partir do desvio, as éguas receberam 8 mg de EPE, uma vez ao dia, por via IM, até que dois ou mais folículos atingissem o diâmetro entre 32 e 35 mm. A ovulação foi induzida com acetato de deslorelina (750 µg, IM) quando os folículos atingiram no mínimo 35 mm. No momento do desvio folicular, da indução da ovulação e do último exame pré-ovulatório foi utilizada a ultrassonografia modo B para medir o diâmetro dos folículos e no oitavo dia pós-ovulação para a área do corpo lúteo; também foi usado Doppler colorido para avaliar a perfusão sanguínea da parede folicular e do parênquima luteal. No ciclo controle foi realizado o mesmo procedimento exceto pelo uso do EPE. Os dados foram submetidos à análise de variância, com nível de

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil. *E-mail para correspondência: mariavet_mcrm@hotmail.com

² Médico Veterinário Autônomo e Responsável Técnico do Laboratório Unicórnio, Brasília, DF, Brasil.

³ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil.

⁴ Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Garanhuns, PE, Brasil.

significância de 5%. Não foi observado efeito do EPE sobre número de ovulações, diâmetro dos folículos, vascularização da parede folicular e concentração sérica de estrógeno. Os animais tratados ou não, apresentaram CLs funcionais, não havendo diferença na área do parênquima ou vascularização luteal, nem na concentração sérica de progesterona, no oitavo dia após a ovulação. Foi observado que o EPE proporcionou um maior número de folículos subordinados no momento da indução da ovulação do folículo dominante ($P \leq 0,05$). Embora estes folículos não tenham chegado a ovular, concluiu-se que o EPE atuou no crescimento de folículos, que podem ser utilizados em outras biotécnicas transferência de oócitos, com maior aproveitamento da reserva folicular de ovários equinos.

Palavras-chave: Equino, Folículo ovariano, fluxo sanguíneo, superovulação.

ABSTRACT

Aiming to evaluate the effect of equine pituitary extract (EPE) on superovulation, the experiment was conducted using six mares Purebred Arabian race in two estrous cycles (control and treatment). The mares were synchronized using prostaglandin F2 α , and monitored daily by ultrasound B mode until the follicles reached diameter ≤ 23 mm (deviation). In the treatment cycle from the deviation mares received 8 mg of EPE, once a day, intramuscularly, until two or more follicles reached a diameter between 32 and 35 mm. Ovulation was induced with deslorelin acetate (750 mcg, MI) when follicles reached at least 35 mm. At the time of follicular deviation, induction of ovulation and final preovulatory exam, it was used B-mode ultrasound to measure the diameter of follicles and on the eighth day after ovulation to measure the area of the corpus luteum (CL); color Doppler was also used to assess blood perfusion of the follicle wall and luteal parenchyma. In the control cycle was performed the same procedure except for the use of EPE. Data were subjected to analysis of variance, with 5% significance level. There was no effect of EPE on ovulation number, diameter of follicles, vascularity of the follicular wall and serum estrogen concentration. The animals treated or not, showed functional CLs, with no difference in parenchymal area or luteal vascularization, or in serum progesterone concentration on the eighth day after ovulation. It was observed that the EPE provided a greater number of subordinate follicles at the time of induction of ovulation of the dominant follicle. Although these follicles have failed to ovulate, it was concluded that EPE influenced the follicles growth, and it can be used in other biotechnologies, with greater utilization of equine ovarian follicular reserve.

Key words: Equine, Ovarian follicle, Blood flow, superovulation.

INTRODUÇÃO

O ciclo reprodutivo na égua se caracteriza por uma fase folicular seguida de fase luteal, decorrente, na maioria das vezes, de uma única ovulação. Na ocorrência da emergência de uma onda folicular ovulatória, os folículos se desenvolvem em uma fase de crescimento comum até o início do desvio em que o folículo dominante continua a crescer e os folículos subordinados começam a regredir. O desvio começa quando o futuro folículo dominante apresenta cerca de 22,5 mm, sendo que a capacidade para a dominância é semelhante entre os quatro maiores folículos, no início do desvio (GINTHER et al., 2004).

Para aumentar a taxa de produção embrionária equina, vários protocolos hormonais já foram utilizados, mas sem obtenção de sucesso. Todavia, o extrato de pituitária equina (EPE) tem sido utilizado com considerável sucesso, principalmente em nível experimental (PIMENTEL e CARNEIRO, 2008).

A superovulação de éguas com EPE, em diferentes protocolos, tem aumentado significativamente o número de ovulações e com isso a obtenção de mais de um embrião por ciclo (SCOGGIN et al., 2002; SQUIRES e McCUE, 2007; ROCHA FILHO, 2005; DIPPERT et al., 1994). Contudo, constatou-se que o tratamento com dose diária baixa foi eficiente para induzir múltiplas ovulações em éguas cíclicas (FARINASSO, 2004). O EPE também tem sido utilizado para induzir a ovulação em animais em fase de transição reprodutiva (BARROS, 2015).

Atualmente, a ultrassonografia modo B vem sendo utilizada na rotina de acompanhamento da dinâmica folicular de éguas. A ultrassonografia com Doppler colorido é uma técnica não invasiva que possibilita avaliar a fisiologia do fluxo sanguíneo do trato reprodutivo, incluindo a vascularização ovariana na égua (AYRES e MINGOTI, 2012; FERREIRA e MEIRA, 2011).

A vascularização da parede folicular ovariana em éguas tem apresentado maior fluxo sanguíneo no futuro folículo dominante, até mesmo dois dias antecedentes à ocorrência do desvio (ACOSTA et al. 2004). Witt et al. (2012), ao estudarem tratamento superovulatório com hormônios gonadotóxicos em éguas verificaram que houve um aumento da perfusão ovariana. Por outro lado, no folículo pré-ovulatório, há uma redução na vascularização da parede, cerca de dois dias antes da ovulação ocorrer (GASTAL, 2007).

A eficiência reprodutiva na espécie equina está aumentando cada vez mais após o incremento da reprodução assistida (PIMENTEL e CARNEIRO, 2008) e, nos últimos anos, estudos demonstraram que a superovulação na espécie equina tem sido uma alternativa para buscar uma maior taxa de recuperação embrionária. Mas, considerando que os resultados ainda não são satisfatórios, é necessário estudar os efeitos do tratamento superovulatório na dinâmica e vascularização folicular. Para isso, a ultrassonografia utilizada como ferramenta de monitoramento da foliculogênese tem sido de relevância fundamental, principalmente em centrais de transferência de embrião. No entanto, o monitoramento com ultrassonografia com Doppler clorido tem sido pouco utilizado, principalmente em associação à superovulação. Com isso, o presente estudo propõe avaliar o efeito do EPE, na dinâmica folicular, perfusão sanguínea folicular e do corpo lúteo, e esteroidogênese de éguas cíclicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas 6 éguas da raça Puro Sangue Árabe, com idade entre 9 e 20 anos, em regime de criação semi-extensivo, alimentadas com pastagem de capim nativo e feno 6 kg/dia/animal, além de ração de manutenção (2,5 kg/dia/animal), sal mineral e água *ad libitum*.

Local de realização do experimento

O experimento foi executado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, localizada em Dois Irmãos, Recife, PE (8° 1' 3" S e 34° 56' 58" W), no período entre fevereiro e maio de 2015.

Desenho experimental

O experimento foi realizado em duas etapas ou ciclos estrais, sendo um ciclo controle e outro tratamento. Aleatoriamente, as éguas que foram avaliadas inicialmente no ciclo controle, no ciclo posterior foram submetidas ao tratamento com Extrato de Pituitária Equina (EPE). Já aquelas éguas que foram inicialmente submetidas ao tratamento superovulatório, após seu término tiveram um ciclo de descanso, que não foi aproveitado para análise e, posteriormente à ovulação deste ciclo, foi iniciada a avaliação do ciclo controle. Este procedimento considerou que não há efeito residual do EPE sobre os ovários no ciclo seguinte ao tratamento (FARIAS, 2013).

Sincronização do cio, superovulação e indução da ovulação

Todas as éguas desse estudo inicialmente tiveram o ciclo estral sincronizado utilizando uma dose luteolítica de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (Dinoprost Trometamina, 1 mg, IM, Lutalyse[®], Zoetis).

No ciclo de tratamento foi administrado EPE, de uma partida extraída de éguas que estavam em anestro estacional, um produto experimental que foi cedido pelo Laboratório Unicórnio, Brasília, DF, sob responsabilidade técnica do Dr. Adalberto Farinasso.

O tratamento com EPE (8 mg, uma vez ao dia, IM) foi iniciado no momento do desvio de um ou mais folículos em crescimento (entre 20 e 23 mm) e a aplicação diária foi interrompida quando a égua apresentou um ou mais folículos com diâmetro entre 32 a 35 mm ou após ter recebido o total de seis doses.

Para indução da ovulação utilizou-se o acetato de deslorelina (0,75 mg, por via IM, Sincrorrelin[®] - Ourofino) em éguas com folículos entre de 35-40 mm, e edema uterino superior a grau 2. As éguas foram inseminadas artificialmente, com semê fresco, 24 horas após à aplicação da deslorelina.

As éguas avaliadas no ciclo controle receberam os mesmos procedimentos, exceto pela administração do EPE.

Ultrassonografia Modo B e Doppler

Tanto no ciclo controle quanto tratado com EPE, após a aplicação de $PGF_{2\alpha}$, as éguas foram monitoradas diariamente por ultrassonografia modo B até o desvio do diâmetro folicular. A partir do desvio, os folículos foram avaliados também pelo modo Doppler colorido para avaliar a perfusão sanguínea folicular até ovulação ocorrer.

Para realização dos exames ultrassonográficos utilizou-se um aparelho de ultrassonografia equipado com Doppler colorido (Mindray – M5 Vet), sendo que os folículos e corpos lúteos (CLs) foram examinados de maneira lenta e contínua, de forma a permitir a visualização dos sinais coloridos correspondentes aos vasos sanguíneos (perfusão) em toda a parede folicular e parênquima luteal (Figura 1). Todos os exames foram gravados para análise posterior. Durante a análise, os folículos foram subjetivamente divididos em quatro quadrantes

e o percentual de parede contendo pontos coloridos foi somado e considerado como o total de perfusão da parede folicular. Os CLs foram avaliados da mesma forma, sendo que o parênquima foi também dividido em quadrantes e considerado o percentual de área com pontos coloridos como sendo o percentual de vascularização do CL (GINTHER e UTT, 2004).

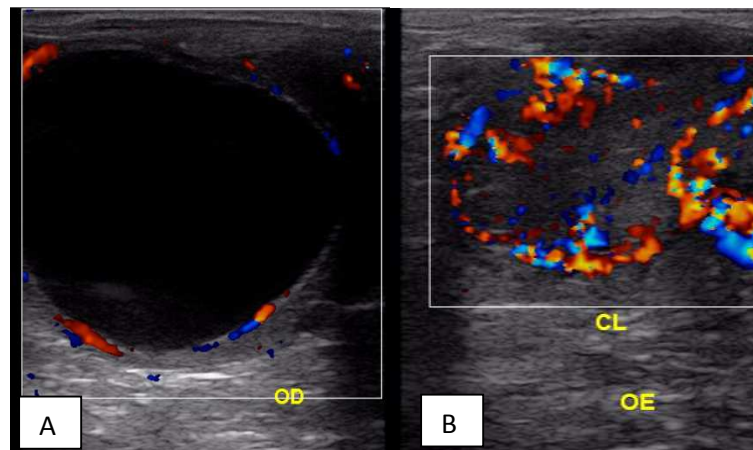


Figura 1 – Imagens ultrassonográficas com Doppler colorido de folículo (A) e de corpo lúteo (B), para análise de perfusão em éguas.

Inseminação Artificial e Coleta de embriões

A inseminação artificial, com sêmen fresco, foi realizada no máximo após 24 horas da indução da ovulação com deslorelina e, no oitavo dia após a ovulação, procedeu-se a coleta do embrião. Para lavagem uterina utilizou-se soro ringer lactato, em torno de 3 a 4 litros, realizando o procedimento pelo sistema aberto. Posteriormente, o embrião foi levado ao Laboratório de Andrologia do Departamento de Medicina Veterinária-UFRPE para avaliação da qualidade. No mesmo dia da coleta de embrião a égua recebeu uma dose de prostaglandina $F_{2\alpha}$ para lise de corpo lúteo.

Os embriões foram lavados em tampão fosfato salino (PBS) suplementado com 1 mg/mL de polivinilpirrolidona (PVP) e fixados em paraformaldeído 4% em PBS, durante uma hora, a temperatura ambiente. Após duas lavagens em PBS/PVP, os embriões foram permeabilizados em 0,5% de Triton X-100 e 0,1% de citrato de sódio em PBS durante 1 hora na temperatura ambiente. Em seguida, os embriões foram lavados três vezes em PBS/PVP e incubados em gotas contendo Hoescht 33342 (10 mg/mL) e Iodeto de Propídeo (125 mg/mL) por 15 minutos no escuro.

Em seguida, os embriões foram lavados três vezes em PBS/PVP, montados em lâminas e cobertos com lamínulas e examinados em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), utilizando os filtros 350 nm e 488 nm, respectivamente. Cada embrião foi analisado para determinação da viabilidade. Os blastômeros que fluoresceram em azul foram considerados viáveis (com membrana plasmática íntegra), enquanto aqueles que fluoresceram em vermelho ou rosa foram considerados inviáveis. Entretanto, embriões com menos de 50% de células vermelhas ou rosas foram considerados viáveis e classificados de acordo com o Manual da Sociedade Internacional de Transfeência de Embriões (ROBERTSON e NELSON, 1998).

Dosagem Hormonal

Amostras de sangue foram coletadas, para dosagem de estrógeno sérico, quando pelo menos um folículo ultrapassou o desvio de diâmetro e no momento da indução da ovulação com deslorelina (folículo com diâmetro entre de 35-40 mm). Para dosagem da concentração de progesterona sérica, foram coletadas amostras de sangue no oitavo dia após a ovulação.

A dosagens foram realizadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando testes comerciais (Estradiol Sym e Progesterona Sym, Symbiosis Diagnóstica Ltda.). A sensibilidade do teste foi de 6,5 pg/mL e 0,157 ng/mL, e o coeficiente de variação intraensaio foi de 14,9 % e 11,8 %, respectivamente para estrógeno e progesterona.

Análise Estatística

As variáveis concentração de estrógeno e progesterona, diâmetros foliculares, número de folículos mensuráveis, percentuais de vascularização da parede dos folículos ovulatórios e do parênquima luteal e área luteal foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e a diferença entre os grupos (controle e tratamento) testada pelo teste de Tukey. Para análise decorrelação entre variáveis, foi utilizado o teste de Spearman. Valores foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a dinâmica do diâmetro e da vascularização folicular e a concentração de estrógeno circulante após tratamento com EPE em éguas. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) no diâmetro e na vascularização folicular entre

os grupos tratado e não tratado com EPE, nos três momentos avaliados: dia do desvio, dia da indução da ovulação com acetato de deslorelina e pré-ovulação (Tabela 1, Figuras 2 e 3).

Tabela 1. Média e desvio padrão dos níveis de estrógeno (E₂) circulante, diâmetro (Ø) e percentual (%) de vascularização do folículo dominante e número (N) total de folículos e ovulações em éguas tratadas com EPE.

	CONTROLE	EPE
N	6	6
E ₂ no desvio (pg/mL)	126,1 ± 46,3	146,8 ± 86,5
E ₂ na indução da ovulação (pg/mL)	152,4 ± 147,9	142,6 ± 112,3
Ø no desvio (mm)	22,7 ± 1,0 A	22,5 ± 1,2 A
Ø na indução da ovulação (mm)	37,7 ± 2,6 B	38,2 ± 7,3 B
Ø na Pré-ovulação (mm)	42,3 ± 5,6 B	42,6 ± 7,8 B
Ø Máximo do Folículo Dominante (mm)	42,1 ± 5,1	42,3 ± 9,1
Ø Máximo do Folículo Subordinado (mm)	22,7 ± 8,0	23,4 ± 6,9
% Vascularização no desvio	48,7 ± 8,8a	50,8 ± 18,7a
% Vascularização na indução da ovulação	47,5 ± 10,1	57,3 ± 17,4
% Vascularização na Pré-ovulação	48,3 ± 14,2	53,0 ± 12,2
N de folículos no desvio (20-23 mm)	1,8 ± 0,9a	3,2 ± 1,3a
N de folículos na indução da ovulação	2,8 ± 1,2 a	4,6 ± 1,0 b
N de Ovulações	1,0 ± 0,0a	1,3 ± 0,5a

ab – Letras diferentes na linha representam diferença significativa (P < 0,05). AB - letras diferentes na coluna, para uma mesma variável entre tempos, representam diferença significativa (P < 0,05).

Estes dados corroboram com os resultados de Farias (2013) que comparou o tamanho médio de folículos pré-ovulatórios de éguas das raças Crioula e Quarto de Milha tratadas com EPE, não observando diferença significativa do grupo controle. Contudo, Gimenes (2010) verificou que éguas tratadas com EPE, recebendo 8 mg duas vezes ao dia, a partir dos folículos

apresentarem 20-23 mm de diâmetro, apresentaram maior número de ovulações quando comparadas ao grupo controle. Porém, este autor utilizou o dobro da dose utilizada neste estudo.

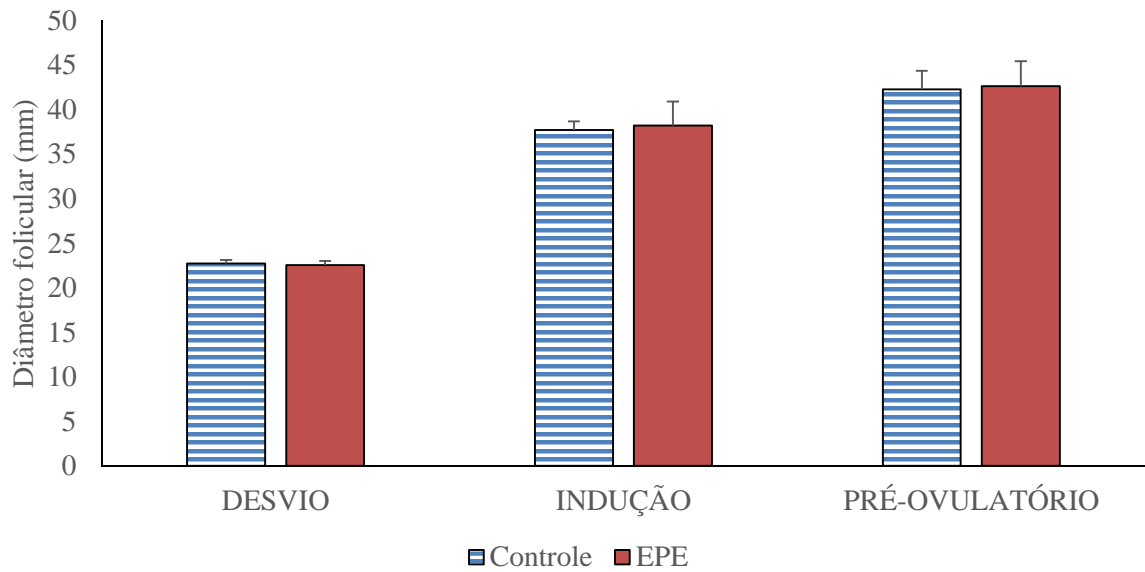


Figura 2. Média e erro padrão da média do diâmetro (mm) folicular no momento do desvio, no dia da indução da ovulação e pré-ovulação dos grupos controle e tratamento com EPE.

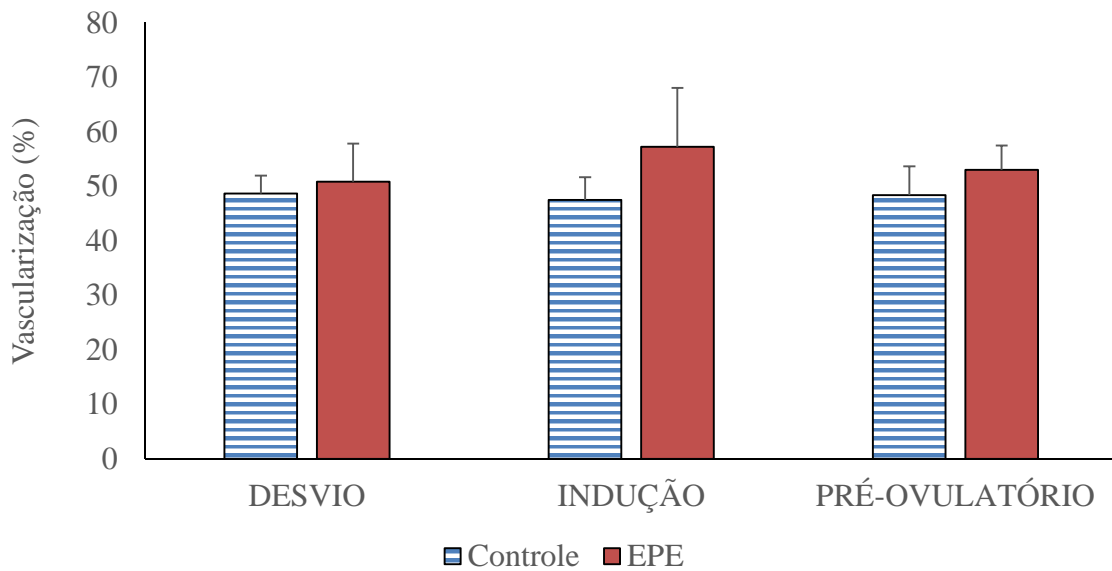


Figura 3 - Média e erro padrão da média do percentual de vascularização folicular no momento do desvio, no dia da indução da ovulação e pré-ovulação dos grupos controle e tratamento com EPE.

Witt et al. (2012) observaram que éguas cíclicas tratadas com eFSH, não apresentaram diferença significativa no fluxo sanguíneo ovariano em relação ao grupo controle decorrente de haver um ou dois folículos em crescimento durante todo o período de avaliação. No entanto, houve um maior fluxo sanguíneo ovariano em éguas com mais de dois folículos, nos ciclos tratados com eFSH, porém este estudo foi realizado avaliando o fluxo da artéria ovariana e não da parede folicular.

Não foi observado efeito do EPE na concentração de estrógeno circulante (Tabela 1), mas, foi detectada uma fraca, mas significativa, correlação dos níveis de estrógeno circulante com a vascularização folicular, no momento do desvio ($P = 0,05$; $r^2 = 0,38$) e no dia da indução da ovulação ($P = 0,05$; $r^2 = 0,33$), independente do tratamento realizado. O efeito vasodilatador do estradiol já é conhecido e deve ser responsável pelo aumento do fluxo sanguíneo dos folículos, conforme já observado no fluxo sanguíneo ovariano, em éguas (WITT et al., 2012) e em bovino (HONNENS et al., 2009). É importante ressaltar que os estudos realizados para avaliar o efeito da superovulação na vascularização, se detiveram em avaliar o fluxo das artérias ovarianas, através dos índices de pulsatividade e resistividade, mas não na microvascularização folicular, como realizado neste estudo.

Estudo realizado por Gastal et al. (1999a) detectou que o nível de estradiol aumenta no início do desvio do futuro folículo dominante. Acosta et al. (2004) verificaram que o fluxo sanguíneo foi maior no futuro folículo dominante cerca de um a dois dias antes do desvio em diâmetro. No entanto, faltam estudos mais aprofundados sobre a relação entre o nível de estrógeno, no desvio folicular, e a vascularização do futuro folículo dominante.

Gastal et al. (2007) observaram uma queda no nível de estradiol nos dois dias antecedentes à ovulação, bem como à medida que se aproximava da ovulação, a vascularização da parede folicular aumentava. Por outro lado, a vascularização da parede folicular reduz a partir de 6 horas antes da ovulação (GINTHER et al., 2007). Em nosso estudo, esta redução não foi observada, provavelmente devido à frequência dos exames (a cada 24 horas).

As variações da onda folicular estão associadas às alterações nos níveis circulantes de FSH e LH e a capacidade dos folículos responderem às gonadotrofinas (DONADEU e PEDERSEN, 2008). O desvio folicular se dá a partir do momento em que os dois maiores folículos alteram a taxa de crescimento diário (GASTAL, 1999 b). Nesse estudo, o número

médio de folículos em crescimento no momento do desvio folicular foi comparado entre o grupo controle e o grupo tratado com EPE, não apresentando diferença significativa ($P > 0,05$).

Já o tratamento com EPE resultou em maior número de folículos em crescimento, no momento da indução com deslorelina, do que os animais não tratados ($P = 0,016$). Resultados semelhantes foram encontrados por Blanco et al. (2009) ao realizarem tratamento com EPE (25 mg), com ou sem associação ao hCG (2500 U.I.), que verificaram uma contribuição significativa para o aumento do número de folículos disponíveis.

Embora este maior número de folículos recrutados não tenha ovulado, no grupo tratado com EPE (Tabela 1), pode-se sugerir a utilização de outra biotécnica, como aspiração folicular, para aproveitamento destes oócitos.

A fraca resposta de ovulação corrobora com o estudo de Rocha Filho (2005) que não verificou diferença no número médio de ovulações entre o tratamento com EPE e seu controle, utilizando dose reduzida de EPE (4 mg/dia). Nosso estudo, foi realizado com 8 mg/dia de EPE, que pode também ser considerada uma baixa dose, comparada a outros estudos que utilizaram entre 12,5 a 50 mg em diferentes frequências (SCOGGIN et al., 2002) e 14 mg/dia (BONIN et al., 2010; FARIAS 2013) havendo um efeito positivo no número de ovulações. Outro aspecto a ser considerado, é que a partida do hormônio utilizada neste estudo, foi obtida de animais em anestro estacional, teoricamente apresentando reduzida quantidade de FSH e LH no produto final, quando comparada as formulações obtidas de éguas em fase cíclica.

Das éguas submetidas a tratamento de superovulação, quatro foram inseminadas artificialmente com sêmen fresco e tiveram embriões colhidos no oitavo dia. Resultando em três embriões (um de cada égua) que apresentavam boa qualidade morfológica e integridade celular. Das éguas controle três foram inseminadas e submetidas à coleta de embrião, em que dois embriões foram obtidos, também com qualidade similar às tratadas (Figura 4).

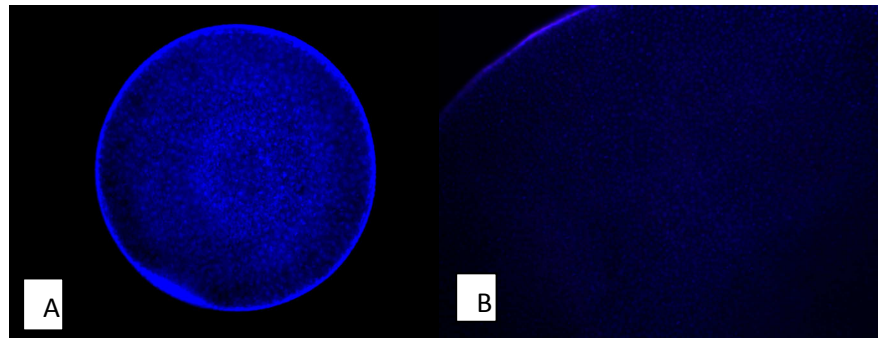


Figura 4 - Imagem de embriões colhidos de égua controle (A) e tratada com EPE (B). A coloração azul indica células íntegras.

Todas as éguas se encontravam em período de ciclos normais durante o experimento, apresentando concentrações séricas de progesterona elevadas (média superior a 11 ng/mL).

Não foi observado efeito do tratamento do EPE sobre a função luteal ($P > 0,05$) (Tabela 2). Os níveis séricos de progesterona foram semelhantes tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com EPE, também verificado em resultados encontrados por Ginther et al. (2007) em que a progesterona atingiu o máximo de concentração no dia 8 (12, 8 ng/mL).

Nesse estudo não foi encontrada correlação entre vascularização, área luteal e nível sérico de progesterona, corroborando com Gomes (2008) e Maia (2015), que compararam a vascularização, área luteal e concentração de progesterona de um grupo de éguas induzidas com acetato de deslorelina com grupo controle, não encontrando nenhuma correlação significativa entre essas variáveis.

A perfusão sanguínea luteal foi avaliada 8 dias após a ovulação, apresentando alto percentual de vascularização. Em estudo realizado por Alonso (2013), foi observado que o máximo de vascularização ocorreu no oitavo dia após a ovulação, independente de ser tratado com hCG ou controle. Já, Ginther et al. (2007) encontraram resultados diferentes observando que o fluxo sanguíneo luteal máximo ocorreu no dia 10 após ovulação. Todavia, Bollwein et al. (2002), ao avaliarem o ciclo estral de éguas com idade acima de 7 anos constataram que a vascularização luteal cresceu até o dia 7 após ovulação, quando começou a declinar.

Tabela 2 – Média e desvio padrão dos níveis de progesterona (P₄) circulante, área luteal total (cm²) e percentual (%) de vascularização do corpo lúteo, 8 dias após a ovulação, em éguas tratadas com EPE.

	CONTROLE	EPE
N	6	6
P ₄ (ng/mL)	11,97 ± 2,51	11,64 ± 3,08
Área total (cm ²)	5,24 ± 0,86	5,91 ± 2,0
% Vascularização	82,66 ± 8,1	83,16 ± 4,4

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o EPE, partida obtida durante o anestro estacional, não foi eficiente para provocar a ovulação de maior número de folículos, e não afetou a dinâmica folicular, tanto no crescimento (diâmetro) quanto na vascularização da parede do folículo, e também na produção de estrógeno. No entanto, o EPE administrado em éguas cíclicas da raça Puro Sangue Árabe (na dose diária de 8 mg) proporcionou um recrutamento maior de folículos, presentes na indução da ovulação, os quais poderiam ser utilizados para outro tipo de biotecnologia, como por exemplo a aspiração folicular para transferência de oócitos.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Adalberto Farinasso pela concessão do EPE, ao Prof. Helio Manso Cordeiro Filho, pela concessão dos animais e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T.J.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. 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, 2004.

ALONSO, M. A. **Efeito da aplicação de hCG em diferentes dias do ciclo estral sobre a concentração sérica de progesterona e fluxo sanguíneo uterino e ovariano em éguas**. 2013. 188 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

AYRES, H.; MINGOTI, G. Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 3. 2012.

BARROS, M. B. S. **Indução de ovulação com acetate de deslorelina e extrato de pituitária equina em éguas cíclicas**. 2015. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; WEBER, F.; STOLLA, R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 43-51, 2002.

BLANCO, I. D.; DEVITO, L. G.; FERREIRA, H. N.; ARAUJO, G. H.; FERNANDES, C. B.; ALVARENGA, M. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Aspiration of equine oocytes from immature follicles after treatment with equine pituitary extract (EPE) alone or in combination with hCG. **Animal Reproduction Science**, v.114, n. 1-3, p. 203-209, 2009.

BONIN, B. F.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; FIORATTI, E. G.; 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. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n. 1, p. 94-103, 2010.

DIPPERT, K. D.; JASKO, D. J.; SEIDEL, G. E.; SQUIRES, E. L. Fertilization rates in superovulated and spontaneously ovulating mares. **Theriogenology**, v.41,n.7, p.1411-1423, 1994.

DONADEU, F. X., PEDERSEN, H. G. Follicle development in mares. **Reproduction Animals domestics**, v. 43, p. 224-231, 2008.

FARIAS, D. K. **Protocolo superovulatório com extrato de pituitária equina (EPE) em éguas da raça Crioula e Quarto de Milha**. 2013. 45 f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal)- Centro de Ciências agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

FARINASSO, A. **Utilização de baixas doses de Pituitária equina na indução de ovulações múltiplas em éguas cíclicas**. 2004. 47f. Dissertação (mestrado em Ciências Agrárias na área de concentração de Produção Animal)- Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília.

FERREIRA, J. C.; MEIRA, C. Aplicação da ultrassonografia colorida doppler em programas de transferência de embriões equinos. **Ciência rural**, v. 41, n. 6, p. 1063-1069, 2011.

GASTAL, E. L., GASTAL, M. O., GINTHER, O. J. Experimental assumption of dominant by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 724-730, 1999a.

GASTAL, E. L., GASTAL, M. O., WILTBANK, M. C., GINTHER, O. J. Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 31-39, 1999b.

GASTAL, E. L., GASTAL, M. O.; DONANDEU, 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 Science**, v. 102, p. 314-321, 2007.

GIMENES, A. M. **Resposta Ovariana em éguas tratadas com baixa dose de extrato de pituitária equina**. 2010. 74 f. Dissertação (Reprodução Animal)- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

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-I on follicular fluid factors and follicle dominance in mares. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1063-1069, 2004.

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, 2007.

GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler Ultrasound in equine Reproduction: Principles, Techniques, and Potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24, n.12, 2004.

GOMES, T. J. S. **Equine corpus luteum vascular evaluation by power doppler ultrasound**. 2008. 66 f. Dissertação (mestrado em medicina veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.

HONNENS, A.; WEISSER, S.; WELTER, H.; EINSPANIER, R.; BOLLWEIN, H. Relationships between ovarian blood flow and ovarian response to eCG-treatment of dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 113, p-1-10, 2009.

MAIA, N.V. **Avaliação da vascularização e da angiogênese de corpos lúteos de éguas com ovulação natural e induzida por acetato de deslorelina**. 2015. 67 f. Tese (doutorado em Ciência Animal Tropical)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

PIMENTEL, C. A.; CARNEIRO, G. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução de equinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas: aplicadas à reprodução animal**. 2ª Ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 145-159.

ROBERTSON, I.; NELSON, R. E. Certificação e identificação de embriões. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (ed.) **Manual da Sociedade Internacional de Transfeência de Embriões**, 3ª. ed. Savory: IETS, 1998. Cap. 9, p. 109-140.

ROCHA FILHO, A. N. **Efeito do tratamento com baixa dose de estrato de pituitária ou FSH purificado equino no crescimento folicular, taxa de ovulação e recuperação embrionária em éguas**. 2005.64f. Dissertação (mestrado em reprodução animal)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

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, n.1, p.151-164, 2002.

SQUIRES, E. L.; MCCUE, P. M. Superovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 1-8, 2007.

WITT, M. C.; BOLLWEIN, H.; PROBST, J.; BAACKMANN, C.; SQUIRES, E.L.; SIEME, H. Doppler sonography of the uterine and ovarian arteries during a superovulatory program in horses. **Theriogenology**, v. 77, n. 7, 2012.