

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FOLICULARES  
AVALIADAS ATRAVÉS DA ULTRASSONOGRAFIA  
MODO-B E DOPPLER COLORIDO DE ÉGUAS JOVENS E  
IDOSAS E SUA RELAÇÃO COM AGENTE INDUTOR E  
MOMENTO DA OVULAÇÃO

RENATA CRISTINA ULIANI

Botucatu – SP

Julho/ 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FOLICULARES AVALIADAS  
ATRAVÉS DA ULTRASSONOGRAFIA MODO-B E DOPPLER  
COLORIDO DE ÉGUAS JOVENS E IDOSAS E SUA RELAÇÃO  
COM AGENTE INDUTOR E MOMENTO DA OVULAÇÃO

RENATA CRISTINA ULIANI

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Pós-graduação em  
Medicina Veterinária para  
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Marco Antonio Alvarenga  
Co-Orientador: Luciano Andrade Silva

Botucatu/SP  
Julho/ 2012

Renata Cristina Uliani. Estudo das características foliculares avaliadas através da ultrassonografia modo-B e Doppler colorido de éguas jovens e idosas e sua relação com agente indutor e momento da ovulação.

## COMISSÃO EXAMINADORA

---

### **Marco Antonio Alvarenga**

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

---

### **Frederico Ozanam Papa**

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

---

### **Julio Cesar Ferraz Jacob**

Membro

Departamento de Reprodução e Avaliação Animal  
Instituto de Zootecnia – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro –  
Seropédica

Data da defesa: 11 de julho de 2012.

*Dedicatória*

---

## Aos Animais

*Pensando bem...*

*... ser veterinário não é só cuidar de animais. É, sobretudo amá-los, não ficando somente nos padrões éticos de uma ciência médica.*

*Ser veterinário é acreditar na imortalidade da natureza e querer preservá-la sempre mais bela.*

*Ser veterinário não é só ouvir miados, mugidos, balidos, relinchos e latidos, mas principalmente entendê-los e amenizá-los.*

*É gostar de terra molhada, de mato fechado, de luas e chuvas.*

*Ser veterinário é não importar se os animais pensam, mas sim que sofrem.*

*É dedicar parte do seu ser à arte de salvar vidas.*

*Ser veterinário é aproximar-se de instintos. É perder medos.*

*É ganhar amigos de pêlos e penas, que jamais irão decepcioná-lo.*

*Ser veterinário é ter ódio de gaiolas, jaulas e correntes.*

*É perder um tempo enorme apreciando rebanhos e vôos de gaivotas.*

*É permanecer descobrindo, através de animais, a si mesmo.*

*Ser veterinário é ser o único capaz de entender rabos abanando, arranhões carinhosos e mordidas de afeto.*

*É sentir cheiro de pêlo molhado, cheiro de almofada com essência de gato, cheiro de baias, de curral, de esterco.*

*Ser veterinário é ter coragem de entrar num mundo diferente e ser igual.*

*É ter capacidade de compreender gratidões mudas, mas sem dúvida alguma, as únicas verdadeiras.*

*É aliviar olhares, é lembrar de seu tempo de criança e querer levar para casa todos os cães vadios e sem dono.*

*Ser veterinário é conviver lado a lado com ensinamentos profundos de amor e vida.*

*(Autor Desconhecido)*

---

*Agradecimientos*

*A Deus, por permitir que isso tudo fosse possível.*

*A FAPESP pelo apoio e incentivo a pesquisa. Para este trabalho foram destinados minha bolsa de mestrado e o auxílio a pesquisa, essencial para sua execução.*

*A toda a FMVZ pelos 8 anos de ensinamentos, aprendizado, carinho. Sinto-me em casa.*

*Ao professor Marco Antonio Alvarenga, orientador, amigo, conselheiro, pela ajuda e força em todos os momentos.*

*Ao professor Luciano Andrade Silva, co-orientador deste projeto, pelo apoio e disposição para discutir e tirar as dúvidas.*

*Aos integrantes da banca examinadora, professor Frederico Ozanam Papa e Júlio Cesar Ferraz Jacob pela dedicação, atenção e contribuição.*

*Aos suplentes da banca examinadora, Rubens Paes Arruda e Cely Marini Melo pela disposição em ajudar.*

*Ao professor José Carlos Pantoja pelas horas dispensadas fazendo toda a estatística longa e confusa deste trabalho.*

*A professora Eunice Oba que cedeu horas de sua noite realizando dosagens hormonais. E por compartilhar pensamentos e risadas.*

*Ao Professor Frederico Ozanam Papa e ao Carlos Schutzer por compartilhar os animais utilizados durante o experimento.*

*A todos os funcionários da EmbrioEqui pela ajuda e pelas risadas. Ao Miguel (Posto de Monta) pelo companheirismo e por cuidar das “meninas”.*

*A todos os estagiários que acompanharam o desenvolvimento do projeto e colaboraram conduzindo animais, segurando a cauda, fazendo perguntas e discutindo os assuntos. Até mesmo quando descongelaram todas as amostras de sangue coletadas durante meses, sem querer.*

*A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal por toda ajuda e conhecimento passado. Minha formação como profissional e pessoal.*

*Aos pós-graduandos e funcionários do departamento de Reprodução Animal pela companhia, em especial a Camila Louise e Caroline Destro. Aos funcionários da seção de pós-graduação.*

*A minha família sempre presente, pelo apoio e paciência.*

*A Lalá, Lidi, Thais e Carol por toda a amizade e carinho de sempre. Também por cuidar da nossa casinha em minha ausência e pelo acolhimento quando já não fazia mais parte dela. Aos Tineném Costelinha e Amarelo e aos agregados João Marcelo e Breno pelos momentos de descontração.*

*A Aline Silva Rocha pelo carinho e atenção e por todos os galhos quebrados enquanto estive fora de Botucatu.*

*Ao Preto, meu mais fiel companheiro, a Piri minha princesinha e ao Brown meu anjinho.*

*A Marianna pela amizade e companheirismo há 20 anos.*

*Ao Bruno Moreira, por todo carinho e ajuda em período integral.*

*Ao Mateus José Sudano por estar sempre disposto a ajudar e incentivar.*

*A Maria Fernanda pela companhia nos momentos “complexos” durante todo o mestrado.*

*Ao Zé di Camargo e Luciano, Jorge e Matheus, Victor e Leo, João Bosco e Vinícius que me acompanhavam em todas as madrugadas a cada quatro horas rumo ao haras, mantendo o ritmo e ajudando a manter-me acordada.*

*Muito obrigada!*



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Concentrações de LH e estradiol de éguas jovens, de idade intermediária e idosas, nos dias próximos à ovulação (Fonte: Jacob, 2007).....	14
Figura 2	Imagem ultrassonográfica de folículo pré-ovulatório equino 32 horas após indução da ovulação. Diâmetro avaliado pela média de duas aferições, altura e largura (medidas apresentadas à esquerda na imagem).....	40
Figura 3	Imagens ultrassonograficas de folículos equinos no momento pré-ovulatório, após indução da ovulação. (A) Folículo apresentando formato regular, (B) Classificação do folículo em formato irregular.....	41
Figura 4	Imagem ultrassonográfica de folículo equino no período pré-ovulatório apresentando 80% de banda anecóica ao redor da circunferência folicular (seta).....	42
Figura 5	Imagem ultrassonográfica de folículo equino no momento pré-ovulatório, após indução da ovulação. Entre as setas, a imagem da camada de células da granulosa (distância entre o fluido folicular e a banda anecóica).....	43
Figura 6	Imagens ultrassonograficas de folículos equinos no período pré-ovulatório, após indução da ovulação. (A) Folículo apresentando baixa ecogenicidade da camada de células da granulosa (seta, escore=1). (B) Folículo apresentando ecogenicidade alta da camada de células da granulosa (seta, escore=3).....	44

- Figura 7 Imagem da ultrassonografia Doppler-colorido de folículos equinos no momento pré-ovulatório, após indução da ovulação. (A) Vascularização folicular baixa (<10% da circunferência folicular). (B) Vascularização folicular alta (70% da circunferência folicular)..... 45
- Figura 8 Imagem da ultrassonografia Doppler-colorido de folículos equinos no período pré-ovulatório, após indução da ovulação. (A) Intensidade das cores alta (escore=3) e (B) Intensidade das cores baixa (escore=1)..... 46
- Figura 9 Diâmetro folicular médio (mm) em todos os ciclos avaliados, nos momentos ind (indução da ovulação), 16, 12, 8 e 4 horas antes da ovulação (0 hora). ..... 50
- Figura 10 Diâmetro folicular de éguas jovens (até 12 anos) e éguas idosas ( $\geq 18$  anos) nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas..... 49
- Figura 11 Diâmetro folicular nos momentos ind (indução da ovulação), 16, 12, 8 e 4 horas antes da ovulação (hora 0) para tratamento 1 (hCG), tratamento 2 (acetato de deslorelina) e tratamento 3 (hCG + acetato de deslorelina)..... 50
- Figura 12 Relação entre formato regular e irregular dos folículos nos momentos ind (indução), 16, 14, 8 e 4 horas antes da ovulação..... 53
- Figura 13 Porcentagem de banda anecóica na circunferência folicular nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas. (0=ovulação). Aumento significativo ( $P<0,05$ ) na banda anecóica em relação ao momento da indução é indicado por asterisco (\*)...... 54

- Figura 14 Porcentagem do folículo apresentando banda anecóica de acordo com a idade das éguas nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas antes da ovulação (0)..... 55
- Figura 15 Porcentagem da parede folicular apresentando banda anecóica de acordo com o tratamento nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas. Tratamento1 (hCG), Tratamento 2 (acetato de deslorelina) e tratamento 3 (hCG + acetato de deslorelina)..... 56
- Figura 16 Espessura média da camada de células da granulosa em todos os ciclos avaliados, nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (0= ovulação). Aumentos significativos ( $P<0,05$ ) na espessura da camada de células da granulosa em relação ao momento da indução são indicados por asterisco (\*) 57
- Figura 17 Espessura média da camada de células da granulosa de éguas jovens e éguas idosas nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (0=ovulação)..... 58
- Figura 18 Espessura média da camada de células da granulosa observadas no tratamento 1 (hCG), tratamento 2 (deslorelina) e tratamento 3 (hCG + deslorelina) os momentos ind (indução), -16, -12, -8, -4 horas (ovulação=0). Aumentos significativos ( $P<0,05$ ) na espessura da granulosa com relação ao momento da indução da ovulação são indicados por asterisco (\*; tratamentos 2 e 3)..... 59
- Figura 19 Escores médios da ecogenicidade da camada de células da granulosa em todos os ciclos avaliados, nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0)..... 60

- Figura 20 Escores médios de ecogenicidade da camada de células da granulosa obtidas na imagem ultrassonográfica nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0) para éguas jovens (até 12 anos) e idosas ( $\geq 18$  anos)..... 61
- Figura 21 Escores médios de ecogenicidade da camada de células da granulosa nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0) nos tratamentos 1 (hCG), 2 (acetato de deslorelina) e 3 (acetato de deslorelina + hCG)..... 62
- Figura 22 Médias da Porcentagem da parede folicular apresentando vascularização nas avaliações realizadas pela ultrassonografia Doppler em todos os ciclos avaliados, nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0). Aumentos significativos ( $P < 0,05$ ) na vascularização folicular com relação ao momento da indução da ovulação são indicados por asterisco (\*). Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre momentos é indicada por (+)..... 63
- Figura 23 Médias das porcentagem da parede folicular apresentando sinais de vascularização quando avaliadas na ultrassonografia Doppler de éguas jovens (até 12 anos) e idosas ( $\geq 18$  anos) nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0)..... 64
- Figura 24 Vascularização folicular média na ultrassonografia Doppler observada nos tratamentos 1 (hCG), 2 (acetato de deslorelina) e 3 (hCG + acetato de deslorelina), nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0). Aumentos significativos ( $P < 0,05$ ) na vascularização da parede folicular com relação ao momento da indução da ovulação são indicados por asterisco (\*)..... 65

Figura 25	Intensidade média das cores observadas na ultrassonografia Doppler em todos os ciclos avaliados, nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0).....	66
Figura 26	Escores médios da intensidade das cores observada na ultrassonografia Doppler de éguas jovens (até 12 anos) e idosas ( $\geq 18$ anos) nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0).....	67
Figura 27	Escores médios de intensidade das cores observados através da ultrassonografia Doppler em todos os tratamentos (1- hCG, 2- acetato de deslorelina, 3- hCG + acetato de deslorelina) nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (0=ovulação)...	68
Figura 28	Edema uterino médio observado na ultrassonografia modo-B em todos os ciclos avaliados nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas antes da ovulação (0). Aumentos significativos ( $P < 0,05$ ) na vascularização folicular com relação ao momento da indução da ovulação são indicados por asterisco (*).....	69
Figura 29	Escores médios de edema uterino de éguas jovens e idosas obtidos pela ultrassonografia modo-B nos momentos indução da ovulação (ind), -16, -12, -8, -4 horas e ovulação (0 hora).....	70
Figura 30	Classificação do edema uterino de éguas quando submetidas ao tratamento 1 (hCG), tratamento 2 (acetato de deslorelina) e tratamento 3 (hCG + acetato de deslorelina), nos momentos ind (indução da ovulação), -16, -12, -8, -4 horas e ovulação (0 hora).....	71

- Figura 31 Escores médios da flutuação folicular em todos os ciclos avaliados obtidos pela palpação retal nos momentos ind (indução da ovulação), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação= 0 hora). Aumentos significativos ( $P < 0,05$ ) na vascularização folicular com relação ao momento da indução da ovulação são indicados por asterisco (\*)..... 72
- Figura 32 Escores médios de flutuação folicular de éguas jovens (até 12 anos) e idosas ( $\geq 18$  anos) obtidos pela palpação retal, nos momentos indução da ovulação (ind), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação= 0 hora)..... 73
- Figura 33 Escores médios de flutuação folicular obtidos através da palpação retal para os tratamentos 1 (hCG), 2 (acetato de deslorelina) e 3 (hCG + acetato de deslorelina) nos momentos ind (indução da ovulação), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação= 0)..... 74
- Figura 34 Crescimento folicular médio das éguas que não ovularam até 48 horas após tratamento para indução da ovulação. Diâmetro apresentado nos momentos 0 hora (indução da ovulação), 32h, 36h, 40h, 44h e 48h..... 75
- Figura 35 Porcentagem média de banda anecóica ao redor da circunferência folicular de éguas que não ovularam até 48 horas após o tratamento para indução da ovulação. Banda anecóica apresentada nos momentos 0 hora (indução), 32h, 36h, 40h, 44h e 48h após a indução da ovulação..... 76

- Figura 36 Escores médios de ecogenicidade da granulosa observada na ultrassonografia modo-B de éguas que não ovularam até 48 horas após o tratamento para indução da ovulação. Valores apresentados nos momentos 0 hora (indução da ovulação), 32h, 36h, 40h, 44h e 48 horas após indução da ovulação..... 77
- Figura 37 Espessura média da camada da granulosa observada na ultrassonografia modo-B de éguas que não ovularam até 48 horas após indução da ovulação. Valores encontrados nos momentos 0 hora (indução), 32h, 36h, 40h, 44h e 48 horas após tratamento..... 78
- Figura 38 Porcentagens médias de parede folicular apresentando vascularização na ultrassonografia Doppler de éguas que não ovularam até 48 horas após o tratamento para indução da ovulação. Avaliações realizadas nos momentos 0 hora (indução), 32h, 36h, 40h, 44h e 48 horas após indução da ovulação..... 79
- Figura 39 Intensidade das cores média avaliada na ultrassonografia Doppler de éguas que não ovularam até 48 horas após tratamento para indução da ovulação. Momentos 0 hora (indução), 32h, 36h, 40h, 44h e 48h após indução..... 80
- Figura 40 Edema uterino médio de éguas que não ovularam até 48 horas após o tratamento para indução da ovulação. Avaliações realizadas nas horas 0 (indução), 32h, 36h, 40h, 44h e 48h..... 81
- Figura 41 Flutuação folicular média observada na ultrassonografia modo-B de éguas que não ovularam até 48 horas após tratamento para indução da ovulação. Avaliações realizadas nos momentos indução (hora 0), 32h, 36h, 40h, 44h e 48 horas após indução..... 82

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Tempo médio de ovulação (horas) de éguas jovens e idosas aos tratamentos para indução da ovulação.....	49
Tabela 2	Diâmetro folicular avaliado através da ultrassonografia modo-B de cada animal, em todos os momentos dos três tratamentos realizados.....	127
Tabela 3	Diâmetro folicular avaliado através da ultrassonografia modo-B de éguas que não ovularam até 48 horas após o tratamento. Valores de cada animal, em todos os momentos dos três tratamentos realizados.....	128
Tabela 4	Valores do edema uterino encontrados através da ultrassonografia modo-B de cada animal, em todos os momentos dos três tratamentos realizados.....	129
Tabela 5	Valores de edema uterino encontrados através da ultrassonografia modo-B de éguas que não ovularam até 48 horas após o tratamento. Valores de cada animal, em todos os momentos dos três tratamentos realizados.....	130



**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

<b>CL</b>	Corpo Lúteo
<b>GnRH</b>	Hormônio liberador de gonadotrofinas
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>FSH</b>	Hormônio folículo estimulante
<b>PGF2 <math>\alpha</math></b>	Prostaglandina F2 $\alpha$
<b>OM</b>	Ovulações múltiplas
<b>IGF1</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
<b>PM</b>	Prenhezes múltiplas
<b>GIFT</b>	Transferência intrafalopiana de gametas
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>PCR</b>	Reação em cadeia de polimerase
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>hCG</b>	Gonadotrofina coriônica humana
<b>ECG</b>	Gonadotrofina coriônica eqüina
<b>ICSI</b>	Injeção intracitoplasmática de espermatozóide
<b>RI</b>	Índice de resistência
<b>PI</b>	Índice de pulsatilidade
<b>US</b>	Ultrassonografia
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>FAH</b>	Folículo anovulatório hemorrágico
<b>IM</b>	Intra-muscular
<b>IV</b>	Intra-venoso
<b>DES</b>	Acetato de deslorelina
<b>OV</b>	Ovulação

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Características reprodutivas da fêmea eqüina.....	5
2.1.1 Ciclo estral da égua.....	5
2.1.2 Dinâmica folicular da égua.....	6
2.2 Diferenças fisiológicas do ciclo de éguas idosas.....	9
2.2.1 Dinâmica folicular.....	10
2.2.2 Hormônios reprodutivos.....	13
2.2.3 Eficiência reprodutiva.....	15
2.2.4 Outras características reprodutivas das éguas idosas.....	18
2.3 Agentes indutores da ovulação.....	20
2.3.1 Gonadotrofina coriônica humana (hCG).....	21
2.3.2 Acetato de deslorelina (análogo de GnRH).....	22
2.3.3 Associações de hCG e acetato de deslorelina.....	24
2.4 Ultrassonografia na reprodução equina.....	24
2.4.1 Ultrassonografia folicular modo-B.....	24
2.4.2 Ultrassonografia Doppler.....	26
2.5 Avaliação do trato reprodutivo através da Ultrassonografia Doppler.....	28
2.5.1 Ultrassonografia Doppler para avaliação folicular.....	29
2.5.2 US Doppler no estudo do desvio e dominância folicular.....	29
2.5.3 US Doppler na detecção do Momento da Ovulação.....	30
2.5.4 Características da dinâmica folicular observadas por US Doppler na fase de transição de primavera.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Seleção dos animais utilizados.....	37
4.2 Acompanhamento folicular, indução da ovulação e avaliação do folículo pré-ovulatório pelas características observadas ao Modo B e Doppler Colorido.....	37

4.4	Análise dos vídeos.....	39
4.5	Análise Estatística.....	47
5.	RESULTADOS.....	48
5.1	Intervalo entre tratamento e observação da ovulação.....	49
5.2	Características foliculares observadas através de ultrassonografia modo-B.....	50
5.3	Características foliculares observadas através de ultrassonografia Doppler-colorido.....	63
5.4	Achados da avaliação ultrassonográfica obtidas pelo modo-B....	69
5.5	Éguas que não ovularam.....	75
6.	DISCUSSÃO.....	83
7.	CONCLUSÃO.....	94
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
9.	ARTIGO CIENTÍFICO.....	110
	ANEXO	127

---

*Resumo*

ULIANI, R. C. Estudo das características foliculares avaliadas através da ultrassonografia modo-b e Doppler colorido de éguas jovens e idosas e sua relação com agente indutor e momento da ovulação. Botucatu. 2012. 153p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Apesar da grande quantidade de éguas idosas presentes nos programas de reprodução, poucos estudos que se preocupam em diagnosticar diferenças reprodutivas apresentadas por esta categoria animal. Sendo assim, este estudo objetivou avaliar as características foliculares de éguas jovens ( $\leq 12$  anos,  $n=11$ ) e idosas ( $\geq 18$  anos,  $n=12$ ) no momento pré-ovulatório, qual o agente indutor da ovulação de eleição para melhorar as características foliculares e se a diminuição da vascularização pode ser utilizada como parâmetro indicativo de iminência da ovulação. As éguas foram induzidas com hCG, acetato de deslorelina e associação dos dois agentes em três ciclos consecutivos de forma aleatória. Foram avaliadas na indução e a cada quatro horas, 32h após a indução até ovular. Modelos lineares de medidas repetidas foram usados para comparar média das variáveis-resposta entre momentos, tratamentos e idades. Teste de Qui-quadrado foi usado para avaliar associação entre formato e momento. Nível de significância estatística 0,05. Quatro horas antes de ovular observou-se diminuição na taxa de crescimento folicular com perda do contorno esférico, banda anecóica em  $51,28 \pm 2,52\%$ , camada de células da granulosa com  $1,95 \pm 0,07$ mm e ecogenicidade  $2,38 \pm 0,07$ , vascularização em  $50,57 \pm 2,03\%$  da parede folicular, edema uterino  $0,74 \pm 0,12$  e flutuação  $2,37 \pm 0,12$ . Todas as características foram semelhantes entre as duas faixas etárias e tratamentos. Éguas que não ovularam apresentaram características muito distintas no período. É possível concluir que características do folículo pré ovulatório não são causa da baixa fertilidade em éguas idosas; não existe tratamento para indução da ovulação de eleição visando melhorar as características foliculares no momento pré-ovulatório; a diminuição da vascularização folicular não é um parâmetro confiável para indicar iminência da ovulação em éguas.

Palavras-chave: Doppler; Éguas; Folículo pré-ovulatório; Indução da ovulação; Modo-B.

---

*Abstract*

ULIANI, R. C. Study of follicular characteristics of young and old mares evaluated by ultrasound B-mode and color Doppler and the relationship with the ovulation-inducing agent and ovulation time. Botucatu. 2012. 153p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Despite the large number of old mares in the breeding programs, few studies have focused on diagnosing reproductive differences presented by this animal category. Therefore, the aim of this study was to evaluate the follicular differences among young mares ( $\leq 12$  years,  $n=11$ ) and old mares ( $\geq 18$  years,  $n=12$ ) in the preovulatory phase, with one is the ovulation inductor of choice for improving the characteristics of follicles before ovulation and if the decrease on follicular vascularity is a good indicator of imminence of ovulation. The mares were induced to ovulate with hCG, delorelin and the association of the two agents in three consecutive cycles at random. The mares were evaluated at the induction and every 4 hours, 32h after induction until ovulation. Linear models for repeated measures were used to compare the average response variables between times for collection, treatment and age. Chi-square test was used to evaluate associations between shape and time of collections. The level of statistical significance was 0.05. Four hours before ovulation, follicles showed a decrease in growth rate with loss of spherical shape, anechoic band in  $51,28 \pm 2,52\%$ , granulose layer with  $1,95 \pm 0,07$ mm and  $2,38 \pm 0,07$  of echogenicity, vascularization in  $50,57 \pm 2,03\%$  of the follicle wall,  $0,74 \pm 0,12$  of uterine edema and  $2,37 \pm 0,12$  of fluctuation. All the characteristics were similar between the two age groups and treatments. Mares that did not ovulate had very different characteristics in the period. In conclusion, low fertility in old mares is not due to preovulatory follicle characteristics; doesn't exist a treatment of choice for ovulation induction to improve the characteristics of the follicle in the preovulatory period; decrease in follicular vascularity isn't a good indicator of imminence of ovulation in mares.

Key-words: Doppler, Mare, preovulatory follicle, ovulation induction, B-mode.

---

## *Introdução*



## 1. INTRODUÇÃO

A equideocultura brasileira ocupa posição de destaque internacional não somente pelo expressivo número de animais, sendo a segunda maior população de equinos puros de raça do mundo, como também pela excelência de seu plantel. Por este motivo, a indústria do cavalo é uma importante área geradora de divisas e empregos no Brasil (ALVARENGA e CARMO, 2009).

Existe um interesse grande por parte dos proprietários de equinos em aumentar a eficiência reprodutiva de seus animais mais valiosos. Em equinos, como em outras espécies de animais de produção, as fêmeas obtêm seu maior valor econômico quando sua progênie se destaca e isto geralmente acontece quando o animal já atingiu uma idade mais avançada.

Fêmeas mamíferas apresentam um declínio gradativo na capacidade reprodutiva com o avançar da idade. A seleção na espécie eqüina não é feita baseando-se nos critérios de fertilidade e o alto valor da prole estimula o uso dos animais em procedimentos de reprodução assistida, fazendo com que muitas éguas permaneçam em reprodução mesmo com idade avançada e baixos índices de fertilidade. O início da subfertilidade ocorre por volta de 10 anos antes do final da fertilidade, sendo assim, o envelhecimento do trato reprodutivo parece ocorrer em éguas com aproximadamente 20 anos de idade (CARNEVALE, 2008).

Além disso, tem sido proposto o uso da espécie eqüina como modelo reprodutivo de mulheres. O uso de roedores como modelo para estudos em reprodução promove uniformidade e coleção de amostras com variação mínima entre animais; entretanto, o potencial para fazer observações repetidas ou estudar variação individual é limitado. Outras espécies animais, como bovinos (MALHI et al., 2005), têm sido propostas como modelo para humanos, mas relativamente poucos desses animais são mantidos em atividade reprodutiva até atingirem idade avançada. Devido ao tamanho e acessibilidade de procedimentos via transvaginal, o folículo equino tem capacidade única para estudo de eventos moleculares durante a maturação *in vivo* dos folículos e oócitos (CARNEVALE, 2008).

Visando a maximização da eficiência reprodutiva de um sistema de criação de equinos, é essencial trabalhar para a obtenção de um produto por ano de todas as éguas do rebanho. Para isso é necessária a integração entre os aspectos fisiológicos, nutricionais e de manejo. Contudo, apesar de toda a evolução que a reprodução animal tem alcançado nas últimas décadas, especialmente na área de biotecnologia, as desordens de origem ovariana continuam causando grande prejuízo econômico, pois produz efeito deletério na taxa de concepção, número de serviços por concepção e sobrevivência embrionária. As desordens ovarianas levam a perda de tempo para produção de embriões durante a estação de monta, dinheiro gasto em tentativas sem sucesso de produzir filhos de indivíduos e risco de descarte de animais de alto valor genético.

Dentre as desordens ovarianas destacam-se falhas na ovulação e conseqüentemente na maturação oocitária, levando a queda da fertilidade. Para tornar possível a avaliação das falhas anteriormente citadas se faz necessário a obtenção de informações que não são passíveis de ser observadas com a utilização da ultrassonografia convencional. Sendo assim, em algumas espécies como humanos e bovinos, a ultrassonografia Doppler tem sido utilizada para avaliar a vascularização da parede do folículo pré-ovulatório e assim fornecer informações a respeito do ambiente intra-folicular, com potencial para prever a ovulação, bem como falhas no seu mecanismo e conseqüente falha na maturação oocitária.

Em função do exposto, este trabalho teve o objetivo central de estudar as características ao modo-B e a vascularização folicular no momento pré-ovulatório de éguas jovens e idosas, bem como sua resposta a diferentes tratamentos para indução da ovulação.

*Revisão de Literatura*

---

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Características reprodutivas da fêmea eqüina**

#### **2.1.1 Ciclo estral da égua**

As fêmeas eqüinas são monovulatórias e, por apresentarem atividade sexual durante a fase do ano de maior luminosidade, são classificadas como poliéstricas estacionais (durante a estação de monta a égua não-gestante apresenta ciclos estrais repetidos). Elas atingem a maturidade sexual (puberdade) por volta dos dois anos de idade, podendo ser esta alterada pela influência das condições corporais, peso, nível de energia, ferormônio e estação do ano (MCKINNON e VOSS, 1993).

A variação sazonal do período de luz durante o dia tem profunda influência no desempenho reprodutivo das éguas. A égua responde positivamente (pelo melhoramento da eficiência reprodutiva) ao aumento no total de horas de luz no dia e negativamente (pela redução da eficiência reprodutiva) ao decréscimo nas horas de luz diárias. Duração do fotoperíodo modula a atividade reprodutiva através da regulação da secreção de GnRH (BLANCHARD et al., 1998).

O ciclo estral é definido como o período de uma ovulação até a ovulação subsequente com cada ovulação sendo acompanhada por sinais de cio e concentrações plasmáticas de progesterona abaixo de 1 ng/mL. Na égua, cada ciclo apresenta duração média de 21 dias, com variação de 16 a 26. Durante o ciclo estral, hormônios envolvendo o eixo hipotálamo, hipófise, ovários e útero se inter-relacionam e exercem papel fundamental na ciclicidade reprodutiva da égua, determinando fases específicas do ciclo (MCKINNON e VOSS, 1993). A duração do diestro permanece relativamente constante em 14-15 dias, porém a duração do estro é variável (variando de 2-21 dias ou mais), sendo tipicamente mais longa no início da estação de monta. O diâmetro do maior folículo no momento da luteólise afeta o intervalo do início do estro até a ovulação: folículos grandes presentes na

regreção do corpo lúteo (CL) tipicamente ovulam mais cedo e são associados ao estro mais curto (BLANCHARD et al., 1998).

### **2.1.2 Dinâmica folicular da égua**

Ginther (1992) definiu as ondas de crescimento folicular em maiores e menores. As ondas maiores caracterizam-se pelo desenvolvimento inicial de um grupo de folículos, sendo que um ou eventualmente dois, são selecionados, crescem rapidamente e exercem dominância sobre os demais. As ondas maiores são subdivididas em ondas primárias e secundárias, de acordo com o momento da emergência. Quando a emergência ocorre durante o estro ou início do diestro, denomina-se onda folicular secundária e dá origem a um folículo dominante de diestro, que entra em atresia. A emergência da onda no meio do diestro é chamada de onda folicular primária, e produz um folículo dominante destinado a ovular durante o estro. As ondas que não apresentam folículo dominante são classificadas pelo autor como ondas menores. As ondas maiores secundárias e as ondas menores são observadas ocorrem com menor frequência (GINTHER e BERGFELT, 1993). A emergência da onda folicular primária ocorre, em média, entre os dias seis e 12 pós-ovulação (variação de dois a 13 dias) em éguas que manifestam uma onda de crescimento folicular durante o ciclo estral. O comprimento do ciclo estral para as éguas que apresentam duas ondas tende a ser mais longo que o daquelas com apenas uma onda folicular durante o ciclo (BURATINI et al., 1997).

A glândula hipófise (ou pituitária) está intimamente ligada a uma porção especializada do cérebro, o hipotálamo, através de neurônios que possuem o corpo celular no hipotálamo e o final do axônio na neurohipófise e também através de elaborado sistema vascular, o sistema porta-hipotalâmico hipofisário. Certos fatores de liberação hormonal produzidos pelo hipotálamo viajam para a glândula pituitária onde ocorre a secreção de hormônios hipofisários específicos. O fator de liberação de maior importância para a reprodução é o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que estimula a liberação de hormônio luteinizante (LH) e

hormônio folículo estimulante (FSH) (PICKETT et al., 1989). Existem dois locais de secreção e produção de GnRH no hipotálamo: os centros controladores de secreção tônica, que secretam GnRH de uma forma relativamente contínua e os centros controladores da onda pré-ovulatória que secretam grandes quantidades de GnRH de uma só vez. O estímulo exato para a liberação de GnRH e padrão de secreção não tem sido determinados com precisão, entretanto, mudanças cíclicas na liberação de LH e FSH são indicativos de liberação de GnRH (GINTHER, 1992).

As gonadotrofinas, além de se distribuírem no organismo via circulação sistêmica, atingem o hipotálamo, pelo vaso de fluxo retrógrado, onde causam um bloqueio parcial na liberação de GnRH (mecanismo conhecido como “feedback” negativo) (PICKETT et al., 1989).

Via circulação, as gonadotrofinas chegam aos ovários, especificamente aos folículos, onde o FSH estimula o desenvolvimento dos mesmos. O FSH exerce papel chave no recrutamento de um número de folículos, cuja ação faz com que esses folículos recrutados iniciem um processo de desenvolvimento sincrônico originando uma onda folicular. O crescimento diário dos folículos recrutados pelas ondas foliculares pode variar de 2,5 a 3,0mm (MCKINNON e VOSS, 1993).

Dentre os folículos recrutados, apenas um, ou eventualmente dois folículos são selecionados e destinados a ovular. O folículo selecionado exerce dominância sobre os demais, ao longo da onda folicular. Com isto, os folículos iniciarão a produção de estrógeno, que via circulação sistêmica atingirá o hipotálamo provocando um efeito negativo na secreção tônica de GnRH e um efeito positivo na secreção de LH na hipófise. O estradiol e a inibina sintetizados pelo folículo dominante são apontados como causa de declínio da concentração plasmática de FSH, que se torna inadequada para manter o desenvolvimento dos folículos subordinados (GINTHER, 1992).

Quando a quantidade de estrógeno na circulação atinge um determinado nível, este sensibiliza áreas superiores do sistema nervoso central, fazendo com que a fêmea manifeste sinais de estro, agindo também nos centros controladores da onda pré-ovulatória de LH, fazendo com que uma grande quantidade deste

hormônio seja liberado na circulação (BLANCHARD et al., 1998). O LH é responsável pela maturação folicular final e ovulação que geralmente acontece um a dois dias antes do final do estro (PICKETT et al., 1989).

O LH é também essencial para formação e manutenção do CL. O declínio deste hormônio após a ovulação é relativamente lento quando comparado com outras espécies, e concentrações basais são obtidas até aproximadamente cinco a seis dias após a ovulação. A ampla onda de LH nas éguas é em contraste com as mudanças agudas vistas em outras espécies domésticas. Níveis baixos de LH durante o diestro podem ser em resposta a um feedback negativo devido a secreção de progesterona.

O diestro é iniciado na ovulação com a formação de um CL secretor de progesterona (P4) (BLANCHARD et al., 1998). As células foliculares remanescentes após a ovulação se luteinizam por ação do LH e se transformam em CL. Dois tipos celulares são observados no CL, as células luteias grandes formadas a partir das células da granulosa e as células luteais pequenas que se originam das células tecais do folículo, ambas possuem característica de células secretoras e são responsáveis pela síntese de P4 durante o diestro.

No diestro, o corpo lúteo produz progesterona em quantidades crescentes a partir da ovulação e concentrações máximas de progesterona circulantes são atingidas aos seis dias após a ovulação (PICKETT et al., 1989). Enquanto permanecer em níveis elevados na circulação P4 é responsável por alterar a liberação de GnRH e das gonadotrofinas hipofisárias, período no qual a égua não apresenta estro novamente. Esta secreção se mantém estável até o décimo quarto a décimo sexto dia do ciclo estral, quando ocorre uma queda acentuada nas concentrações plasmáticas de progesterona em consequência da luteólise, processo dependente da liberação endógena de prostaglandina F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) pelo endométrio (GINTHER, 1992). A PGF<sub>2</sub>α é absorvida pela drenagem uterina, entra na circulação, e chega aos ovários por uma rota sistêmica. Luteólise rápida é causada pela PGF<sub>2</sub>α, resultando em um declínio na concentração circulante de progesterona (uma diminuição detectável ocorre dentro de quatro horas, com concentrações abaixo de 1 ng/mL ocorrendo dentro de 40 horas da liberação

inicial de PGF2 $\alpha$ ), que então libera o bloqueio da onda pré-ovulatória de LH. Maturação folicular e comportamento característico de fase folicular então se iniciam. A duração do diestro permanece relativamente constante em 14-15 dias e isso não é afetado pela estação (BLANCHARD et al., 1998).

## **2.2 Diferenças fisiológicas do ciclo de éguas idosas**

O declínio da fertilidade relacionado à idade em fêmeas tem pelo menos dois componentes básicos: a diminuição da taxa de concepção/prenhez por ciclo e um aumento das taxas de morte embrionária e abortamento nesses animais.

Originalmente, as éguas têm 40.000 folículos primordiais e ciclaram durante 25 anos; assim usando em média 100 folículos/ciclo poderá esgotar toda a sua reserva de folículos primordiais (100 folículos x 16 ciclos/ano x 25 anos = 40.000 folículos primordiais) nesse período. Presumivelmente, o “pool” de folículos primordiais é finito, principalmente por não ter sido citado, até o presente momento, a ocorrência de mitoses em oogônias de potras ou éguas (GINTHER, 1992), porém o número de oócitos primordiais remanescente nos ovários de éguas velhas ainda não foi determinado.

O efeito da idade sobre a atividade ovariana tem sido caracterizado também pelo decréscimo do volume ovariano, pela redução do número de folículos antrais e pela menor vascularização do estroma ovariano em mulheres idosas (KUPESIC et al., 2003). Não foi observada atividade ovariana em 37% de fêmeas equinas acima de 24 anos, e somente 50% das éguas pôneis  $\geq$  20 anos tiveram ovulações sequenciais (VANDERWALL et al., 1993). Em outro estudo realizado por Carnevale et al. (1994) 19% das éguas idosas não apresentaram desenvolvimento de um folículo ou ovularam durante 60 dias de monitoração durante período reprodutivo. As informações obtidas até o presente momento são muito conflitantes e isto pode ocorrer devido ao entendimento incompleto do desenvolvimento folicular e ovulação em éguas idosas além da relativa inacurácia das técnicas utilizadas, como palpação retal e acesso ao material de abatedouro. Poucas informações estão disponíveis sobre o efeito da idade na reprodução de



éguas idosas e o melhor entendimento dos fatores que levam a queda da eficiência reprodutiva poderia ajudar a identificar éguas com alto risco de falha na concepção e então encaminhá-las para monitoramento cuidadoso.

### **2.2.1 Dinâmica folicular**

A disfunção ovariana tem sido apontada como causa do decréscimo da eficiência reprodutiva em éguas idosas. Antes de completar a inatividade ovariana, éguas idosas demonstram clara redução na atividade folicular com intervalos longos entre ovulações e número de folículos reduzidos sugerindo um crescimento final do folículo pré-ovulatório mais lento ou um intervalo de tempo maior para atingir o diâmetro folicular máximo para ovulação (DAVIS MOREL et al., 2010).

Carnevale et al. (1993a) encontraram intervalos interovulatórios de  $23,9 \pm 0,6$ ,  $23,0 \pm 0,8$  e  $26,5 \pm 0,7$  dias para éguas jovens, com idade intermediária e velhas, respectivamente. Esse prolongado período interovulatório ocorreu em consequência do prolongamento da fase folicular e, conseqüentemente, ao prolongado intervalo da indução da luteólise até a ovulação. No final da fase luteal e no dia do tratamento com PGF2 o diâmetro do maior folículo presente no ovário de éguas velhas era menor quando comparado ao diâmetro do maior folículo de éguas jovens no mesmo momento. Da mesma forma, um prolongado período interovulatório foi citado por Vanderwall et al., (1993) em éguas velhas (16-20 anos) quando comparado ao das fêmeas entre 10 e 11 anos de idade. Parece que o tempo prolongado para a ovulação foi devido, ao menos em parte, ao status folicular reduzido no momento da luteólise no grupo mais velho. Diferente do encontrado em éguas, em vacas, a duração do período interovulatório não mudou com a idade quando se comparou vacas velhas (13 – 14 anos) com as suas filhas (1 – 4 anos) (MALHI et al., 2005). Em mulheres, observa-se que nos anos que precedem o período de transição para a menopausa, ocorrem ovulações regulares, enquanto o ciclo menstrual é progressivamente encurtado. Tal fenômeno se deve ao encurtamento da fase folicular (KLEIN et al., 2002).

Jacob (2007) verificou que para éguas velhas, a taxa de crescimento folicular não diferiu das éguas de meia idade, porém foi menor ( $P < 0,05$ ) que nas éguas jovens, mesmo não havendo diferenças no diâmetro do maior folículo. Dados parecidos foram encontrados por Carnevale et al. (1993a) e Ginther et al. (2009) que demonstraram taxa de crescimento do folículo pré-ovulatório durante os cinco dias anteriores a ovulação maior em éguas jovens que em éguas idosas, porém sem diferença no diâmetro do folículo no dia anterior a ovulação em éguas com 20 anos ou mais (CARNEVALE et al., 1993a). Contudo, em estudo recente, Davis Morel et al. (2010) notaram que a média do diâmetro do folículo pré-ovulatório variou de  $33,3 \pm 4,66$  mm (éguas  $\geq 19$  anos) a  $38,95 \pm 5,61$  mm (éguas de 2 a 4 anos). Sendo assim, a idade da égua teve um efeito negativo significativo ( $P < 0,001$ ) na média do diâmetro, com o tamanho do folículo diminuindo  $0,935$  mm para cada período de três anos de idade.

Éguas idosas apresentam população reduzida de folículos antrais em desenvolvimento vistos na imagem ultrassonográfica. O número médio de folículos apresentou diminuição significativa acompanhada do aumento da idade da égua (CARNEVALE, 2008). Segundo Ginther et al. (2009), mais ( $P < 0,03$ ) folículos atingiram  $\geq 10$  e  $\geq 15$  mm durante a fase de crescimento comum no grupo jovem que nos grupos intermediário e idoso, porém o número de folículos atingindo  $\geq 20$ ,  $\geq 25$ , e  $\geq 30$  mm não foi diferente entre os grupos. Assim como em éguas, o número de folículos na onda folicular foi menor em vacas (MALHI et al., 2005) e mulheres (KIM, 1995) idosas. Tal observação pode ser uma consequência do grande reservatório de folículos disponíveis para recrutamento nos ovários de éguas jovens (GINTHER et al, 2009).

No período transicional, a atividade folicular foi reduzida em éguas idosas. Com o aumento da idade ocorreu uma diminuição concomitante no número de folículos em desenvolvimento antes da primeira ovulação do ano. Três de nove éguas idosas tiveram apenas um folículo de  $\geq 20$  mm antes da primeira ovulação do ano e a atividade folicular nos seus ovários foi intensamente reduzida, demonstrando um estado de iminência de inatividade ovariana (CARNEVALE et al., 1997).

Na imagem ultrassonográfica porém, não houve efeito da idade nas mudanças na parede folicular como ecotextura ao modo-B ou porcentagem de parede folicular com sinais de fluxo sanguíneo ao color-doppler no folículo pré-ovulatório (GINTHER et al., 2009).

O mecanismo que controla as ovulações múltiplas (OM) nas éguas não é claro. Em vacas não existe associação entre OM e aumento das gonadotropinas, ao invés disso é sugerido que OM podem ocorrer devido a: sensibilidade aumentada dos folículos a gonadotropinas, inibição diminuída dos folículos subordinados pelo folículo dominante ou a um aumento na produção ovariana/estimulação por IGF1 (ECHTERNKAMP et al., 2004).

Prenhez múltiplas (PM) são correlacionadas com OM, por isso é esperado que o aumento na idade seja associado com aumento nas PM. Entretanto, o aumento na idade é associado com aumento na mortalidade embrionária, possivelmente sendo contraditório a qualquer efeito do aumento de OM. Em estudo realizado por Davis Morel et al. (2005) as taxas de OM foram mais altas (35,6%) em éguas de 17-19 anos e mais baixas (20,7%) para éguas de 2-4 anos. Além disso, éguas mais velhas demonstraram taxa de concepção geral por ovulação de OM de 44,3%, indicando que taxa de concepção por óvulo de OM foi mais baixa que a esperada para ovulações únicas e se prenhes, as taxas de PM foram significativamente ( $p < 0.01$ ) mais baixas que éguas jovens. Isso pode indicar baixa viabilidade de oócitos de OM com consequência na baixa taxa de fertilização e aumento na mortalidade embrionária antes do dia 13/14. O referido estudo sugere que o aumento na OM com a idade é mais que compensado pela diminuição na transformação de OM em PM, por isso éguas idosas não estão necessariamente em risco de produzir PM, mas sugere-se que as mesmas sejam monitoradas de perto. Neste estudo foi avaliado também o tamanho da vesícula embrionária com relação à idade da égua não sendo demonstrados efeitos significativos da idade no diâmetro da vesícula, entretanto éguas idosas tenderam a produzir vesículas menores. Tais vesículas pequenas podem ser um dos fatores que causam perda embrionária em éguas mais velhas tanto para OM como para ovulações únicas. As reais razões para diminuição na taxa de prenhez em éguas

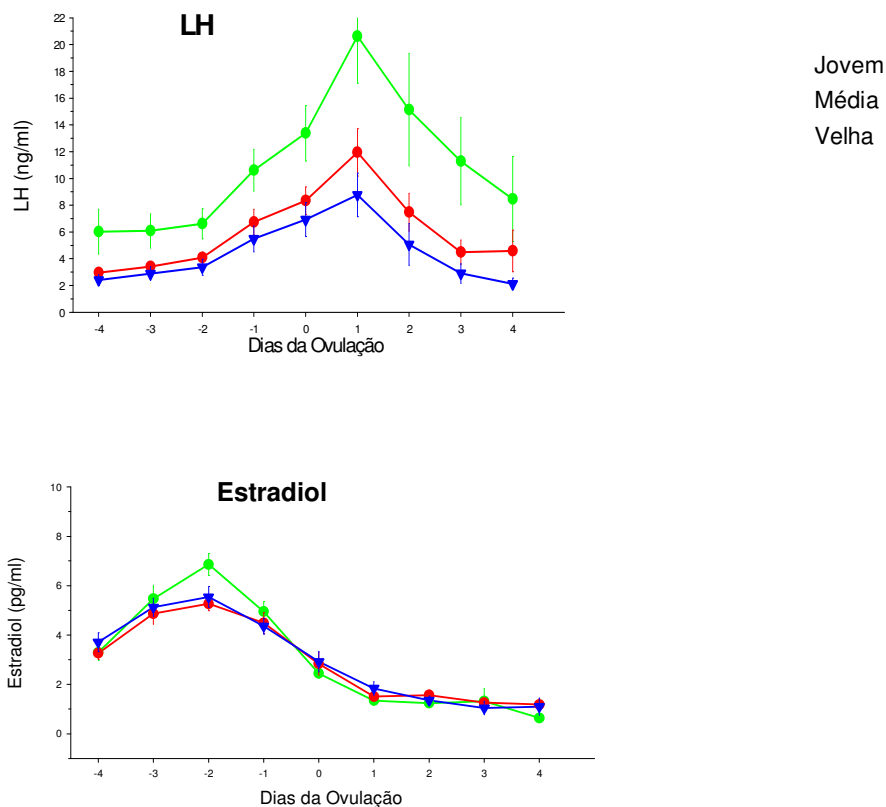
idosas, em particular éguas idosas de OM, ainda não estão explicadas (DAVIS MOREL et al., 2005).

### **2.2.2 Hormônios reprodutivos**

Na égua, a idade pode também afetar os níveis dos hormônios reprodutivos (CARNEVALE et al., 1993a), embora em bovinos os níveis de gonadotropinas não tenham sido afetados pela idade das vacas (MALHI et al., 2005).

Concentrações de gonadotropinas foram elevadas até o fim da fase reprodutiva de mulheres (TE VELDE et al., 1998) e éguas (CARNEVALE et al., 1994). O sinal inicial de envelhecimento reprodutivo na égua é o início da diminuição da ciclicidade reprodutiva com elevadas concentrações de FSH. As mudanças hormonais foram sugeridas como reflexo das secreções ovarianas alteradas de hormônios moduladores do FSH, incluindo estradiol e inibina. A concentração máxima de FSH durante a fase comum de crescimento foi menor no grupo jovem que no grupo idoso e pode ser consequência da maior secreção de inibina por um maior número de folículos em crescimento nos ovários de éguas jovens. Em um grupo de mulheres de 46-56 anos de idade com ciclos menstruais regulares, concentrações de FSH foram mais altas que para mulheres jovens. Foi sugerido que o aumento nas concentrações de FSH em mulheres também ocorra em consequência da queda progressiva na quantidade de folículos em crescimento e sua habilidade reduzida de regular FSH (TE VELDE et al., 1998).

Éguas idosas ( $\geq 20$  anos) apresentaram menores concentrações de LH durante o período ovulatório, sendo este hormônio em média 45% e 55% maior no grupo jovem que no grupo intermediário e velho, respectivamente, embora esses baixos valores não tenham interferido no processo de ovulação nesses animais (JACOB, 2007). Neste mesmo trabalho foi observado que não existe um efeito da idade nas concentrações sistêmicas de estrógeno (Figura 1). A redução das concentrações de LH relatada em éguas velhas pode refletir no prolongamento da fase folicular (CARNEVALE et al., 1993a). Segundo Sherman et al. (1976), concentrações de LH em mulheres não são alteradas pela idade.



**Figura 1.** Concentrações de LH e estradiol de éguas jovens, de idade intermediária e idosas, nos dias próximos à ovulação (Fonte: Jacob, 2007)

Ginther (1992) relata que a produção insuficiente de progesterona pode ser causa de morte embrionária em éguas idosas. Isso pode ser pelo fato de que éguas idosas necessitem de maiores concentrações de progesterona para estabelecimento e manutenção da gestação. Apesar de o LH ser necessário para estimulação luteal (GINTHER, 1992), baixas concentrações máximas de LH nos grupos mais velhos não refletiram em baixas concentrações de progesterona. Em contraste, o grupo idoso teve uma concentração média de progesterona mais alta quando comparado as éguas mais jovens (CARNEVALE et al, 1993a). Em outro estudo, Vanderwall et al. (1993) encontraram ausência de efeito da idade sobre as

concentrações plasmáticas de progesterona durante dois períodos ovulatórios. Tais resultados são similares aos estudos envolvendo bovinos, onde as concentrações plasmáticas de progesterona não diferiram entre vacas idosas e novilhas (MALHI et al., 2005). Os fatores que controlam os efeitos da idade nas concentrações de progesterona não são conhecidos.

### **2.2.3 Eficiência reprodutiva**

A queda na qualidade do oócito é o fator primário que afeta o desempenho reprodutivo de éguas e mulheres mais velhas. As causas e o momento em que este declínio ocorre não estão bem determinados (CARNEVALE, 2008). A diminuição na eficiência reprodutiva em éguas acima de 15 anos está demonstrada na diminuição da taxa de prenhez e na taxa de nascimentos por ano.

Carnevale e Ginther (1995) reportando os resultados da transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) com oócitos coletados de folículos pré-ovulatórios de éguas velhas (> 20 anos) e jovens (6 – 10 anos), sendo que somente os oócitos maduros foram transferidos para receptoras jovens, observaram menores taxas de prenhez para o grupo de éguas idosas. Após a transferência, oócitos de éguas idosas resultaram em 31% de prenhez versus 92% das éguas jovens, confirmando assim o declínio da fertilidade com a idade, sendo o oócito um dos fatores primários.

Se uma ligação entre diminuição do tamanho folicular, diminuição da viabilidade oocitária, e em consequência, desempenho reprodutivo mais pobre existe, pode ser esperado que ocorra ovulação de um folículo pré-ovulatório que não chegou ao final da divisão meiótica e/ou maturação antes da ovulação (DAVIS MOREL et al., 2010). Segundo Losinno (2006), as éguas velhas ovulam frequentemente oócitos com alterações na cromatina nuclear, diminuindo assim o índice de fertilidade desta categoria. Esse autor, comparando oócitos de éguas velhas e jovens obtidos após recente ovulação, encontrou 18,5% apresentando distribuição errônea das organelas citoplasmáticas em éguas velhas e 5,6% em éguas jovens. Comparando o estágio de maturação nuclear (metáfase x estágio

não determinado) obteve 71,4% de oócitos de éguas jovens em metáfase (I ou II) e 28,6% em estágio não determinado, e no grupo de éguas velhas, 46,6% em metáfase (I ou II) e 53,4% não determinado. Ainda, os oócitos das éguas mais velhas possuem outras anormalidades morfológicas não vistas em oócitos de éguas jovens, incluindo vesícula grande dentro do ooplasma (ocupando mais de 52% da área total do oócito) ou associada com o núcleo, com formato irregular, áreas do ooplasma sem organelas e seções do oolema com microvilos. (CARNEVALE et al., 1999).

Um aumento significativo na fração dos vacúolos no ooplasma foi também observado em oócitos de mulheres de idade avançada (38-45 anos) versus jovens (25-32 anos) após avaliação de biópsias ovarianas (DE BRUIN et al., 2004). A vacuolização aumentada parece ser causada por acúmulo dos danos no oócito (DE BRUIN et al., 2004). As causas dos defeitos morfológicos dentro dos oócitos de fêmeas idosas não são conhecidas. Mutações no DNA mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio têm sido encontradas como efeito importante nos oócitos de fêmeas idosas com potencial para comprometer a segregação cromossomal (THOUAS et al., 2005)

A patofisiologia mitocondrial é um marcador citoplasmático do complexo processo degenerativo do envelhecimento de muitos tipos celulares, particularmente em células metabolicamente ativas como as do coração e sistema nervoso central (THOUAS et al., 2005). Disfunção metabólica nas mitocôndrias pode resultar em dano oxidativo do citoplasma e estruturas nucleares tanto quanto um aumento na probabilidade de degeneração apoptótica e necrótica. Oócitos humanos e embriões novos de mulheres de idade avançada clinicamente inférteis contêm mitocôndrias com características ultraestruturais similares às daquelas de células senis ou células somáticas em degeneração incluindo vacuolização, protuberâncias e deposição mineral (DE BRUIN et al., 2004). Carga mitocondrial reduzida pode resultar em defeitos metabólicos como perda de prótons e elétrons, que aumentam progressivamente com o avanço da idade das células somáticas (DE BRUIN et al., 2004) e pode levar ao aumento do dano peroxidativo. Além disso, níveis de ATP têm sido correlacionados com resultados no desenvolvimento

embrionário pré e pós-implantação, e então desenvolvimento atrasado tem sido especulado por estar envolvido com déficits na energia metabólica.

Similarmente, oócitos humanos com diminuição do conteúdo de ATP provavelmente possuem desenvolvimento comprometido. Rambags et al., (2008), estudando através de PCR o número de cópias de ácido desoxirribonucléico (DNA) de oócitos e embriões provenientes de éguas jovens (< 12 anos) e idosas (>15 anos), observaram que os embriões de éguas jovens possuíam mais mitocôndrias do que seus oócitos, já nas éguas idosas a quantidade de mitocôndrias não aumentou nos embriões quando comparado aos seus oócitos, indicando um atraso na replicação mitocondrial.

Vários estudos têm indicado que a perda embrionária é a maior causa da diminuição na taxa de prenhez de éguas subférteis com incidência de 39% versus 17% quando comparado a outras éguas, entre dias 15 e 50 após ovulação (VILLAHUZ et al., 1985). Carnevale et al. (1993b) demonstraram que blastocistos provenientes de éguas idosas apresentavam menos células totais, menores escores de qualidade e tendiam a ter menor diâmetro. Também foi sugerido que os defeitos de desenvolvimento do embrião ou ambiente do oviduto podem explicar a falha no estabelecimento da gestação em éguas idosas e subférteis. Para éguas jovens e velhas, respectivamente, a taxa de concepção por ciclo foi 57 e 31% e a taxa de nascimento por estação foi 82 e 48%. Em experimento controlado (CARNEVALE e GINTHER, 1992), éguas jovens (5 a 7 anos) e velhas ( $\geq 15$  anos) foram inseminadas usando o mesmo garanhão e manejo de cobertura similar. A taxa de prenhez no dia 12 foi significativamente menor para éguas velhas que para éguas jovens (32% versus 100%), e a perda embrionária foi significativamente maior para éguas velhas do que para jovens (62 e 11%). O estabelecimento da prenhez não foi afetado pela idade da receptora (LEGRO et al., 1995).

Segundo Ball et al. (1989) as taxas de prenhez não foram significativamente diferentes para éguas idosas subférteis e éguas jovens normais dois dias após a ovulação. Entretanto, ao dia 14 após a ovulação, taxas de prenhez foram significativamente menores em éguas subférteis que em éguas normais. A taxa de



perda embrionária entre os dias dois e 14 foi 73% em éguas subférteis e 0% em éguas normais.

Embriões morfológicamente normais de sete ou oito dias foram transferidos para o útero de receptoras normais ou subférteis. No dia 28 após ovulação a taxa de sobrevivência embrionária foi similar entre éguas receptoras normais e subférteis, sendo assim, o ambiente uterino não foi a maior causa de perda embrionária inicial em éguas subférteis. A sobrevivência reduzida ( $P < 0,1$ ) de embriões de qualidade intermediária de éguas subférteis comparados com embriões intermediários de éguas doadoras normais, entretanto, indicaram que fatores outros que aqueles que foram morfológicamente aparentes podem ter responsabilidade pela sobrevivência de embriões de éguas subférteis (BALL et al., 1989).

#### **2.2.4 Outras características reprodutivas das éguas idosas**

Anormalidades morfológicas do trato genital têm sido fortemente relacionadas com o efeito da idade sobre a capacidade reprodutiva de fêmeas equinas. Dentro deste contexto, concluí-se que anormalidades estruturais são mais comuns em animais idosos.

O fator idade é comumente confundido com outros fatores, entre eles a nutrição e estado de condição corporal ocupam lugar de destaque. Animais idosos em manutenção têm aparente redução da digestibilidade de proteína e fósforo. Além disso, éguas idosas podem ser susceptíveis às deficiências nutricionais por causa da demanda cumulativa de produção de potros e por causa da decrescente utilização de nutrientes. Portanto, recomenda-se que animais em reprodução devem receber atenção individual e alguns sinais de queda do status devem ser seguidos, sem demora, de um completo exame clínico. Problemas dentários podem levar à deficiência nutricional e provocar tendência da diminuição no desempenho reprodutivo por alterações perineais e vulvares que predispõem a infecções ascendentes e endometrites (MCKINNON e VOSS, 1993).

Alterações no ambiente uterino ocupam lugar de destaque quando se trata de animais idosos, e a observação da queda de fertilidade deve ser cautelosa quando na presença desta categoria de alteração. Dentre as afecções uterinas importantes, as mais comuns e as que causam maiores prejuízos nos programas de reprodução assistida são as inflamações uterinas ou endometrites. O sistema imune da égua sofre um declínio na sua eficiência com o avançar da idade, com redução da habilidade de fornecer fagócitos, imunoglobulinas e componentes do sistema complemento. Éguas com idade avançada e susceptíveis a endometrite demonstraram menor capacidade de limpeza uterina, acumulando fluido uterino após contato com o espermatozóide ou inoculação bacteriana durante o estro (LEBLANC, 1997). O fluido pode estar presente devido à menor limpeza uterina através do cérvix, ou devido à atividade diminuída dos vasos linfáticos, em função de distúrbio no mecanismo de contração uterina (LEBLANC, 1994). A razão do déficit na limpeza uterina não está bem estabelecida, mas anormalidade miometrial, exaustão do músculo liso uterino, sinais hormonais inapropriados controlando as contrações uterinas e conformação perineal anormal têm sido apontados como fatores etiológicos (VANDERWALL e WOODS, 2003).

Como consequência das inflamações uterinas é também importante destacar as lesões no oviduto, principalmente a salpingite. O ambiente do oviduto é importante para o desenvolvimento embrionário inicial e lesões nesta estrutura podem ser causa de morte embrionária (MCKINNON e VOSS, 1993).

Envelhecimento e grande número de partos no decorrer da vida produtiva também são associados à presença de cistos uterinos com consequente dificuldade na fixação embrionária e baixas taxas de gestação aos 12 dias (GINTHER, 1992). Ainda nas afecções uterinas, a atrofia endometrial senil (com redução aparente do número de glândulas) é associada com idade avançada das éguas (MCKINNON e VOSS, 1993). Também como consequência de gestações repetitivas, os animais estão suscetíveis à perda da prega vulvovaginal (a prega vulvovaginal serve como barreira às invasões bacterianas ascendentes, sua perda leva à pneumovagina e aumenta a suscetibilidade à endometrite), saculações uterinas (resultando de atonia miometrial focal e atrofia endometrial) e aumento da

duração do anestro pós parto (em consequência à baixa condição corporal ou parto no início da estação de monta) (LEBLANC, 1997).

Riscos de problemas para levar uma gestação a termo aumentam com a idade. Entre elas, ruptura da parede abdominal (rupturas da musculatura ventral e ruptura do tendão pré-púbico) e ruptura de vasos sanguíneos como consequência da degeneração vascular (ruptura da artéria uterina média, artéria íliaca interna, artérias uterinas e artérias ovarianas) (MCKINNON e VOSS, 1993). Por estes motivos, inserção de uma égua idosa em um programa de reprodução deve ser cuidadosa e uso de biotecnologias podem fornecer métodos de superar problemas e riscos acompanhados do envelhecimento.

### **2.3 Agentes indutores da ovulação**

O uso de agente indutores da ovulação é uma ferramenta-chave no manejo reprodutivo equino. As maiores vantagens de ter uma ovulação em tempo previsto incluem: (1) uma cobertura por ciclo para garanhões de alta demanda; (2) coberturas programadas para éguas que são transportadas até o garanhão; (3) poucas coberturas com redução da contaminação uterina (particularmente em éguas com limpeza uterina deficiente ou susceptibilidade a infecções uterinas aumentada); (4) inseminações próximas da ovulação para sêmen resfriado ou congelado, ou para garanhões de baixa fertilidade; (5) garantia de intervalo adequado entre coberturas naturais para garanhões muito requisitados; (6) sincronização entre doadoras e receptoras em programas de transferência de embriões; e (7) redução de trabalho e custo veterinário. Devido a todas as vantagens de se ter uma ovulação em tempo previsto, assim como pelo aumento na taxa de prenhez em coberturas em momento próximo a ovulação, os agentes farmacológicos utilizados para este fim são amplamente empregados em reprodução eqüina (SAMPER, 2008)

### 2.3.1 Gonadotrofina coriônica humana (hCG)

O hormônio mais comumente utilizado para indução da ovulação é a gonadotrofina coriônica humana (hCG), e vários estudos têm testado sua eficácia para este propósito em éguas. O hCG é uma proteína constituída de duas cadeias de peptídeos contendo galactose e hexosamina com peso molecular de 30.000 e meia vida de 8 a 12 horas. A sub-unidade alfa do hCG é igual a de outras gonadotrofinas, e 51% da sequência de aminoácidos da sub-unidade beta é semelhante à da gonadotrofina coriônica eqüina (ECG; SUGINO et al., 1987). Pelo fato da sub-unidade beta do ECG possuir a mesma sequência de aminoácidos do LH equino, supõe-se que o LH e o hCG apresentam cerca de 50% de similaridade nesta sub-unidade. Devido a sua semelhança com o LH, o hCG também estimula seus receptores foliculares, apresentando as mesmas ações de maturação oocitária, folicular e ovulação (WILSON et al., 1990). O hormônio é produzido pelos citotrofoblastos da vesícula coriônica da placenta humana e é eliminado na urina poucas semanas após a concepção, atingindo seu pico aproximadamente em 50 dias de gestação e diminuindo a quantidades insignificantes em seguida (MCDONALD, 1988).

Dosagens entre 750 a 5000 UI de hCG já foram testadas, mas ainda não foi estabelecido um consenso de qual é a dose mais eficiente. Usualmente, 2500 UI de hCG são injetadas por via intravenosa em éguas apresentando folículo  $\geq 35$ mm de diâmetro com a ovulação ocorrendo em até 48 horas após a injeção, em mais de 75% das éguas tratadas. A fertilidade não é afetada com o uso do hCG (LOY & HUGHES, 1966; VOSS et al., 1975).

Os estudos são bastante contraditórios no que se refere a eficácia do tratamento com hCG. Diversos autores relatam acima de 90% de resposta ao agente, com a ovulação ocorrendo até 48 horas após o tratamento (DAVIS MOREL e NEWCOMBE et al., 2008; BLANCHARD et al., 2002; GASTAL et al., 2006c). Porém, apesar de o hCG ser amplamente utilizado na reprodução eqüina, já foi demonstrado que seu uso freqüente em éguas pode levar a formação de anticorpos anti-hCG com uma perda subsequente na eficiência da resposta

(MCCUE et al., 2004; BARBACINI et al., 2000; WILSON et al., 1990). Duchamp et al., (1987) verificaram que as éguas imunizadas contra o hCG não ovulavam no tempo esperado após sua administração. Por estas razões, recomenda-se a aplicação do hCG por apenas dois ciclos estrais em cada estação de monta (MCCUE et al., 2004), devendo substituí-lo por outros indutores em ciclos subseqüentes. Sendo assim, há muitos anos, vários estudos são realizados em busca de uma solução farmacológica alternativa na indução da ovulação em éguas (SULLIVAN et al., 1973; VOSS et al., 1975).

Sabe-se que o hCG, ao mimetizar as ações do LH, é capaz de estimular a esteroidogênese. De acordo com Sousa et al. (2007), a utilização deste agente na indução de ovulações determinou um maior número de éguas receptoras aptas à transferência de embriões (com elevado tônus uterino e cervical e ausência de edema endometrial). Por outro lado, ao compararem as concentrações de progesterona de éguas induzidas com o hCG com éguas controle (ovulação espontânea), Urquieta et al. (2009) não verificaram concentrações plasmáticas diferentes entre os grupos.

### **2.3.2 Acetato de deslorelina (análogo de GnRH)**

O GnRH é uma ferramenta que serve como alternativa naquelas éguas que não respondem da forma esperada ao hCG (BARBACINI et al., 2000). O acetato de deslorelina (deslorelina) é um análogo do GnRH aparentemente 100 vezes mais potente que o GnRH (PADULA, 2005). A deslorelina age na pituitária estimulando a liberação endógena de LH pela égua.

Os primeiros testes (HARRISON et al., 1991) mostraram que o análogo de GnRH deslorelina e o hCG foram igualmente efetivos e consistentes na indução da ovulação, com taxas de prenhez similares. Porém como eram necessárias aplicações freqüentes deste hormônio (a cada 12 horas, em média 3.8 injeções) seu uso foi considerado muito trabalhoso quando comparado a uma única injeção de hCG suficiente para induzir a ovulação (SQUIRES et al., 1994).

Seu uso na forma de implante de liberação lenta (Ovuplant, Fort Dodge Animal Health) foi iniciado em 1999. Quando administrado a éguas com folículo  $\geq 30$  mm de diâmetro, a ovulação ocorreu dentro de 2 dias em mais de 88% das éguas (JÖCHLE e TRIGG, 1994; JÖCHLE et al., 1997). Após o primeiro ano disponível comercialmente, vários veterinários relataram demora para retornar ao estro após a aplicação do implante. A maioria das éguas tratadas demonstraram um prolongamento do intervalo inter-ovulatório de três a sete dias, já outras apresentaram  $>30$  dias de intervalo (MOREHEAD e BLANCHARD, 2000; VANDERWALL et al., 2001). Além disso, o uso de implante foi associado a diminuição das concentrações de LH um e dois dias após a ovulação, quando comparados com as éguas controle. Foi também associado a diminuição na secreção de FSH durante o período de diestro seguinte a ovulação. A diminuição do FSH levou a diminuição do desenvolvimento folicular e a uma demora na emergência do próximo folículo dominante, resultando no intervalo inter-ovulatório aumentado (FARQUHAR et al., 2001).

A remoção do implante de deslorelina na hora da ovulação foi indicado para prevenir a supressão folicular subsequente e o retorno atrasado ao estro (MCCUE et al., 2002). Porém a remoção do implante de deslorelina, apesar de um processo relativamente simples, pode ser condenável para alguns veterinários ou proprietário de éguas.

Estudos recentes demonstraram que a deslorelina em veículo líquido biodegradável de liberação rápida injetado i.m. é tão efetiva em induzir a ovulação quanto na forma de implante. Essa forma injetável de deslorelina não reduziu o número de folículos grandes no diestro e portanto não resultou em atraso do retorno ao estro (STICH ET AL., 2004). Utilizando 1,0mg de deslorelina em veículo injetável intra-muscular, Melo et al. (2005) detectaram ovulações em 79,3% das éguas entre 24 e 48 horas após sua aplicação, quando estas apresentavam um folículo  $\geq 35$ mm. Segundo Samper (2008), o intervalo esperado entre aplicação da deslorelina e a ovulação é de 40 a 46 horas.

### **2.3.3 Associações de hCG e acetato de deslorelina**

O uso combinado de agentes indutores, como o hCG e a deslorelina, é recomendado em éguas idosas que se prestam à doação de oócitos, por supostamente favorecerem a maturação folicular e oocitária (CARNEVALE et al., 2005). Contudo, não há estudos determinando os possíveis benefícios da administração simultânea destes medicamentos em éguas.

Em vacas, através do emprego de técnicas de biologia molecular, detectou-se a expressão de diferentes tipos de receptores para LH nas células da granulosa folicular (NOGUEIRA et al., 2007). Estes receptores possuem afinidades distintas pelas moléculas de hCG e LH endógeno (MULLER et al., 2003). Apesar de não haver estudos semelhantes em folículos equinos, é possível que suas células da granulosa possuam, como em vacas, variadas isoformas de receptores de LH, justificando o emprego de associações entre o hCG e análogos de GnRH para a indução e obtenção de benefícios secundários.

## **2.4 Ultrassonografia na reprodução equina**

### **2.4.1 Ultrassonografia follicular modo-B**

O sêmen depositado no útero no momento da cobertura ou inseminação leva cerca de quatro horas para atingir o oviduto (local da fertilização) e realizar a capacitação. Passadas 48 horas da cobertura ocorre uma diminuição no número de espermatozóides viáveis no interior do trato reprodutivo da fêmea com conseqüente redução da fertilidade (PICKETT, et al., 1988). O uso de sêmen congelado, refrigerado ou de baixa qualidade pode diminuir ainda mais o tempo de sobrevivência dos espermatozóides após a inseminação. Esses fatores, somados a queda da viabilidade do oócito da égua dentro de 12 a 14 horas após a ovulação justificam a necessidade de prever a ovulação o mais próximo de ela acontecer. Cobertura ou inseminação logo antes da ovulação, particularmente com sêmen de longevidade reduzida, poderia maximizar a taxa de prenhez e prevenir o desgaste

desnecessário de um ganhão (PICKETT et al., 1988). Em outros casos, predizer precisamente o momento da ovulação pode permitir a recuperação de oócitos equinos maduros para ICSI ou transferência de oócitos de éguas subférteis. Além disso, oócitos ovulados recentemente ou embriões recém clivados poderiam ser recuperados do oviduto em momento específico pós-ovulação (MCKINNON et al., 1988).

Após a seleção folicular os folículos ovarianos equinos crescem a uma taxa de 2,5 a 3,0mm ao dia (MCKINNON e VOSS, 1993). Após a indução até a ovulação essa taxa de crescimento apresenta uma queda importante (GASTAL et al., 2006a; SILVA et al., 2006). Concomitantemente ocorre a diminuição da tensão do folículo em aproximadamente 70% das éguas. Ultrasonograficamente, este fato é associado com uma mudança no formato do folículo de esférico para alongado ou irregular (MCKINNON et al., 1988), que pode ocorrer devido ao rompimento do estroma ovariano quando o folículo se dirige em direção a fossa preparando-se para a ovulação e a liberação do oócito.

O processo ovulatório foi descrito como uma reação inflamatória, incluindo hiperemia, congestão, aumento da permeabilidade vascular e edema. Baseando-se nisso, o acúmulo de fluido formando na imagem ultrassonográfica uma banda anecóica ao redor do folículo pode ser atribuído ao edema ou ao acúmulo excessivo de fluido nos espaços intercelulares oriundo dos capilares vasculares e terminais linfáticos. Uma dilatação considerável de capilares na teca foi descrito com a proximidade da ovulação em éguas (KERBAN et al., 1999). A formação de uma banda anecóica na área entre as camadas da teca aumentou diariamente e progressivamente no período de três a um dia antes da ovulação (GASTAL et al., 1998). Segundo Gastal et al. (1998 e 2006a) a banda anecóica atingiu 100% da circunferência folicular no período pré-ovulatório.

Na maioria dos folículos pré-ovulatórios ocorre um espessamento da parede folicular (MCKINNON et al., 1988). O afrouxamento das células é provavelmente um processo envolvido na liberação do complexo cumulus-oócito. Segundo Kerban et al. (1999), a administração de hCG induziu mudanças microscópicas evidentes na camada de células da granulosa, que aumentou tanto



em número de células mas principalmente em volume, provocado pelo afrouxamento evidente da camada de células da granulosa resultante do acúmulo de material mucoide entre as células. O tratamento com gonadotropina resultou em um aumento significativo na espessura da camada de  $77,8 \pm 4,8$  para  $158,8 \pm 4,8$   $\mu\text{m}$  entre 0 e 39h após hCG ( $P < 0,01$ ). O acúmulo foi progressivo, mas maior entre 36 e 39h após administração de hCG ( $P < 0,01$ ). A natureza exata das mucosubstâncias secretadas durante a expansão celular precisa ser determinada, mas provavelmente inclui membros da família dos glicosaminoglicanos (ácido hialurônico, heparan sulfato ou dermatan sulfato) (KERBAN et al., 1999). A presença dessas mucosubstâncias provavelmente aumenta a qualidade refletiva das interfaces teciduais sendo responsável pelo aumento na ecogenicidade da granulosa antes da ovulação (KERBAN et al., 1999).

O edema endometrial aumenta progressivamente durante os primeiros dias do estro, mas diminuiu com a proximidade da ovulação (HAYES et al., 1985). O útero sob influência de estrógeno apresenta um padrão de característica de edema uterino que pode ser descrito como roda de carroça, facilmente detectável durante a avaliação. A diminuição no padrão de edema uterino é acelerada pelo uso de agentes indutores da ovulação conforme a égua se aproxima da ovulação (SAMPER 2008).

#### **2.4.2 Ultrassonografia Doppler**

A tecnologia Doppler baseia-se na emissão de ondas ultrassônicas pelo transdutor, que são refletidas na forma de eco pelas células vermelhas em movimento no interior dos vasos sanguíneos. Estas ondas são maiores ou menores dependendo do tipo de movimento das células sendo este em direção ou contra o transdutor (GINTHER & MATHEW, 2004).

Existem dois modos pelos quais o fluxo sanguíneo pode ser avaliado utilizando-se a tecnologia da ultrassonografia Doppler, o Doppler colorido e o power-doppler. No Doppler colorido a imagem apresenta diferentes colorações que são caracterizadas como o fluxo que corre em direção ao transdutor e o fluxo

que corre contra. O Power-doppler apresenta tonalidades de uma única cor que variam de acordo com a intensidade do fluxo sanguíneo (GINTHER, 2007). Existe ainda o modo-espectral que fornece valores exatos de velocidades de fluxo sanguíneo e índices Doppler teciduais (GINTHER & MATTHEW, 2004). A adequada mensuração das velocidades de fluxo sanguíneo é dependente da correta angulação entre o transdutor e o respectivo vaso (ângulo de insonância). Alterações no ângulo de insonância podem ter efeitos drásticos sobre os valores absolutos das velocidades de fluxo sanguíneo de um vaso (GINTHER, 2007). Devido a grande tortuosidade das artérias presentes no mesométrio, ovários e útero, não é possível determinar seus respectivos ângulos de insonância. Os índices de resistência (RI) e pulsatilidade (PI) não sofrem influência do ângulo de insonância, sendo assim indicados para a avaliação da hemodinâmica do útero e vasos anexos (SILVA et al., 2005). RI e PI arterial apresentam correlação negativa com a perfusão vascular do tecido irrigado pelo mesmo, ou seja, quanto menor RI e PI maior será a perfusão vascular no tecido suprido por aquele vaso (GINTHER, 2007).

Quando um número adequado de pixels contíguos é codificado com a mesma cor, a área se torna visível como um local colorido na imagem. Uma legenda ou mapa de cores é mostrado no monitor do ultrassom, representando as graduações de cores. Na imagem color Doppler, a orientação do transdutor afeta a direção percebida do fluxo e conseqüentemente as cores, ou seja, o fluxo é relativo a orientação do transdutor apresentando em vermelho o fluxo que vai em direção ao transdutor e em azul o fluxo que vai contra o transdutor. A cor vermelha varia do vermelho escuro para o laranja e amarelo, enquanto a porção azul parte do azul escuro para azul esverdeado. Um deslocamento do centro da barra (demarcação entre vermelho e azul) para as extremidades (superior e inferior) representa aumento na velocidade do fluxo. Ou seja, na ultrassonografia Doppler, a legenda de cores expressa a velocidade do fluxo sanguíneo dentro do vaso. Cores mais claras representam fluxo mais rápido enquanto tonalidades mais escuras representam fluxo mais lento (GINTHER, 2007).

## 2.5 Avaliação do trato reprodutivo através da Ultrassonografia Doppler

Tanto o útero quanto os ovários e suas estruturas podem ser avaliados pelo uso da ultrassonografia Doppler. O CL é uma das estruturas mais vascularizadas do organismo, fato este impressionante levando-se em consideração o curto período no qual seu desenvolvimento e regressão ocorrem (GINTHER et al., 2007c). Estudo recente caracterizou a relação entre a perfusão sangüínea com o desenvolvimento (estrutural e funcional) do CL (GINTHER et al., 2007c). O aumento da vascularização folicular é acompanhado pelo aumento na produção de progesterona pelo CL. Uma boa vascularização do CL é essencial, pois serve de substrato para a biossíntese de progesterona e secreção de outros hormônios esteróides pelas células luteais. Dessa forma, a circulação sanguínea é vital para que o CL mantenha suas propriedades funcionais (BOLLWEIN et al., 2003). Considerando a íntima relação entre a perfusão vascular do CL e a concentração sérica de P4, a US Doppler pode ser utilizada no momento da seleção da receptora para a avaliação da funcionalidade do CL.

Considerando distúrbios vasculares como potenciais causadores de alterações degenerativas do endométrio (FERREIRA et al., 2008), e que estas por sua vez estão intimamente relacionadas com casos de subfertilidade em éguas, a US Doppler é uma importante ferramenta para o estudo da viabilidade endometrial, assim como para a interação conceito-maternal. É conhecido que uma pobre perfusão uterina pode ser a causa de infertilidade em fêmeas. Estudos realizados em mulheres demonstraram que uma baixa perfusão uterina durante a fase luteal está associada com uma baixa taxa de concepção (BOLLWEIN et al., 1997).

Alguns trabalhos já foram realizados também com relação a gestação. Durante a fase de mobilidade embrionária em éguas, alterações na perfusão vascular endometrial ocorrem de forma localizada em associação com mudanças da posição do conceito (SILVA et al., 2005). Informações sobre a aplicação da US Doppler nas fases intermediária e final da gestação ainda são escassas. Os

estudos realizados até o momento são descritivos e caracterizam anatomicamente o sistema vascular do feto e útero gestante (GINTHER, 2007).

### **2.5.1 Ultrassonografia Doppler para avaliação folicular**

Poucos, contudo estimulantes, são os trabalhos encontrados na literatura com uso do Doppler na avaliação folicular, tendo sido este, até o momento, utilizado para estudar vascularização do folículo pré-ovulatório (GASTAL et al., 2006a; GINTHER et al., 2007b), predizer maturação oocitária (GINTHER et al., 2007b), verificar qualidade folicular e oocitária (SIDDIQUI et al., 2009) e estabelecimento de prenhes (SILVA et al., 2006) entre outros assuntos.

As características dos folículos ovarianos da égua não prenhe estão relacionadas com mudanças no seu estágio reprodutivo. Estudos envolvendo o hipotálamo, glândula pineal, e concentrações de hormônios circulantes forneceram informações importantes durante anos. Recentemente, várias adaptações estão sendo realizadas no ultrassom para avaliar com mais ênfase os folículos como objetivos dos estudos. Estas inovações incluem: 1) Ablação dos folículos por ultrassonografia (US) transvaginal guiada, 2) Amostragem transvaginal e tratamento experimental dos folículos, e 3) Ultrassonografia Doppler para verificar as alterações na vascularização da parede folicular. Essas tecnologias avançadas têm produzido resultados que encorajam uma adequação dos conceitos atualmente conhecidos sobre dinâmica folicular e sazonalidade reprodutiva da égua (GINTHER et al., 2004a).

### **2.5.2 US Doppler no estudo do desvio e dominância folicular**

O desvio folicular é precedido pela fase de crescimento comum que dura vários dias. Durante esta fase, os folículos apresentam uma taxa de crescimento similar e cada um deles tem a capacidade de se tornar dominante (GASTAL et al., 2004). Neste momento, um extenso plexo vascular se desenvolve na camada da teca ao redor da membrana basal avascular e da camada da granulosa. Foi

sugerido que a distribuição de gonadotropinas e nutrientes via sistema vascular mais desenvolvido apresenta relação com seleção e crescimento do folículo dominante e que o suporte vascular insuficiente contribui para a atresia folicular (WULFF et al., 2002). Neste contexto, o desvio folicular em éguas é indicado morfológicamente não somente pela taxa de crescimento diferenciada entre os folículos dominante e subordinado em desenvolvimento, mas também por uma aparente expansão da camada anecoica vista ao ultrassom, como expressa subjetivamente, ao redor da granulosa do folículo dominante (GASTAL et al., 2004). Esta mudança na ecotextura bem como o aumento dos sinais coloridos de fluxo sanguíneo vistos ao Doppler distinguem o futuro folículo dominante do maior futuro folículo subordinado cerca de um dia antes do início do desvio do diâmetro e essa característica foi atribuída ao aumento da vascularização. Em outro estudo, Acosta et al. (2004b) observaram que antes mesmo de a alteração na área de fluxo sanguíneo poder ser vista no modo colorido, a análise espectral revelou que a velocidade no pico sistólico e o tempo-médio de velocidade máxima do fluxo sanguíneo começam a ser maiores no folículo dominante em média 6mm (equivalente a dois dias) antes do desvio no diâmetro folicular. Apesar de as concentrações do fator de crescimento endotelial vascular no fluido folicular terem sido maiores no maior folículo um dia após o esperado início do desvio (GINTHER et al., 2004b), a relação inicial de VEGF com o desvio vascular não é conhecida.

### **2.5.3 US Doppler na detecção do Momento da Ovulação**

Atualmente, a eminência da ovulação em éguas é estimada na ultrassonografia modo-B pela combinação de espessura e ecogenicidade da camada de células da granulosa, diminuição da turgidez com perda do contorno esférico do folículo, destacamento de segmentos da granulosa e manchas ecogênicas no antro, associado à diminuição do edema uterino, sendo possível prever o momento da ovulação com 24 horas de antecedência (CARNEVALE et al., 1988). Da mesma forma, uma banda anecóica vista ao modo-B aumenta progressivamente na camada da teca do folículo pré-ovulatório durante os dias

que antecedem a ovulação representando o aumento fluxo sanguíneo do folículo visto no modo colorido (GASTAL et al., 2006a).

Em estudo recente, Gastal et al. (2006a) observaram na ultrassonografia por Doppler que nas últimas quatro horas que precedem a ovulação ocorre uma diminuição na porcentagem da circunferência do folículo com apresentação colorida juntamente com uma diminuição na intensidade das cores. As duas superfícies da granulosa (voltada para o antro e para a teca interna) se tornam irregulares durante as ultimas poucas horas que antecedem a ovulação (GASTAL et al., 2006b). Este fenômeno é chamado de serração da granulosa e é visto mais proeminente na base do folículo oposta ao ápice (futuro local de ovulação). Neste estudo os autores notaram também a formação de uma área apical não vascularizada reconhecida pela alteração no formato esférico do folículo poucas horas antes da ovulação, indicando o futuro ponto de ruptura.

Em éguas, aumento da corrente sanguínea e aumento no diâmetro do folículo pré-ovulatório entre momento da indução da ovulação e 30 horas após injeção de hCG foi associado com melhores taxas de prenhez (SILVA et al., 2006). Além disso, sinais mais intensos de cor intraovarianos indicaram decréscimo nos índices de resistência (aumento da perfusão vascular) e aumento na velocidade do sangue em éguas que ficaram gestantes (SILVA et al., 2006). Contudo o próprio autor ressalta a necessidade do uso de maior número de animais para confirmar estes achados. Ginther et al., (2007b) realizam estudo no qual aspiraram folículos 30h após tratamento com hCG e avaliaram a maturação oocitária. Eles observaram que o fluxo sanguíneo foi melhor para o grupo de oócito não recuperado que oócito recuperado e melhor para o grupo de oócito maduro que oócito imaturo. A análise espectral não revelou diferenças entre os grupos. Esses resultados são inconsistentes com estudos anteriores e por isso foram considerados inconclusivos. Em outro estudo, Siddiqui et al. (2009) avaliaram o fluxo sanguíneo da parede folicular após tratamento com hCG de éguas que apresentaram anticorpos contra hCG e éguas que não apresentaram anticorpos. Os folículos foram aspirados 30h após e não apresentaram diferenças entre os grupos quanto a taxa de recuperação oocitária, porém apresentaram

significativamente menos fluxo sanguíneo na parede folicular de éguas anticorpos-positivo que para éguas anticorpos-negativo. A análise espectral não apresentou diferenças entre os grupos.

Distúrbios na ovulação podem ser apresentados na forma de evacuações septadas com descarga prolongada e não ovulação com a posterior formação de um folículo anovulatório hemorrágico (FAH). Evacuações septadas são associadas com melhores serração e vascularização da parede folicular uma hora antes da ovulação quando comparada a evacuação normal, incluindo também a área apical (GINTHER et al., 2007a). Serração e vascularização em éguas com evacuação normal não foram encontrados no pólo apical. Se o oócito foi incluso na descarga prolongada é desconhecido (GINTHER et al., 2007a). Estudando os FAHs, Ginther et al. (2006) notaram que o diâmetro folicular não foi diferente entre os folículos que ovularam e os que formaram FAH no dia anterior a ovulação. Os resultados também indicaram que concentrações elevadas de estradiol sistêmico poucos dias antes da ovulação esperada e melhor vascularização do folículo no dia anterior da ovulação estão envolvidos na conversão de um folículo pré-ovulatório viável em um FAH, porém os resultados ainda não são consistentes, pois as avaliações foram realizadas com intervalos longos de 24h.

#### **2.5.4 Características da dinâmica folicular observadas por US Doppler na fase de transição de primavera**

A transição entre as estações ovulatória e anovulatória ocorre na primavera e é frequentemente caracterizada pela formação de um ou vários folículos dominantes anovulatórios até um folículo dominante ovulatório terminar a estação anovulatória (ACOSTA et al., 2004a). As características do desvio folicular são similares entre as fases. Durante o crescimento de 20 para 30 mm, os folículos crescem a uma mesma taxa, sendo o tamanho do folículo incapaz de identificar sua saúde. A tecnologia color-Doppler distinguiu entre futuros folículos dominantes ovulatórios e anovulatórios com acurácia razoável. No dia em que o folículo atingiu 35mm, a área vascularizada foi de 0,48 a 0,81cm<sup>2</sup> no grupo ovulatório e de 0,12 a 0,28 cm<sup>2</sup> no grupo anovulatório (ACOSTA et al., 2004a).

O diâmetro do folículo pré ovulatório no dia anterior a ovulação é aproximadamente 5mm maior antes da primeira que antes da segunda ovulação do ano (GINTHER 1990). Porém, em um estudo utilizando ultrassonografia doppler, Gastal et al. (2007) observaram uma taxa de aumento da vascularização muito reduzida precedendo a primeira ovulação (dia 0) do ano, sendo a área vascularizada ( $\text{cm}^2$ ) da parede folicular similar entre os grupos pré-ovulatórios no dia -6, mas muito menor no dia -1 precedendo a primeira ovulação do ano, podendo esta característica ser utilizada para identificar a saúde do folículo e assim evitar perdas econômicas.



---

*Objetivos*

### 3. OBJETIVOS

O presente trabalho objetivou responder os seguintes questionamentos:

A vascularização folicular é um parâmetro confiável para indicar iminência da ovulação em éguas?

A vascularização do folículo pré-ovulatório é diferente entre éguas jovens e éguas idosas quando sua indução é realizada com diferentes agentes indutores da ovulação?

A vascularização do folículo pré-ovulatório é alterada quando a indução da ovulação é realizada com diferentes agentes indutores?

A ultrassonografia Doppler é capaz de diferenciar folículos que irão ovular de folículos que não irão, até 48 horas após a indução?

A ultrassonografia Doppler é uma ferramenta importante para ser utilizada a campo para melhor detectar o momento da ovulação, complementando as informações obtidas com a ultrassonografia convencional?

## *Material e Métodos*

---

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Seleção dos animais utilizados**

O trabalho foi realizado em duas etapas, em dois locais distintos sendo a primeira metade nos meses de setembro a dezembro de 2010, na EmbrioEqui – Central de Reprodução Equina situada na cidade de São Simão/SP, latitude 21°28'45" e altura 665 metros. Posteriormente (janeiro a março de 2011) utilizados animais pertencentes à FMVZ – UNESP Botucatu, situados no Posto de Monta desta instituição, latitude 22°53'09" e altura 804 metros. Todos os animais apresentavam ótimo estado de condição corporal e foram divididos em dois grupos: Jovens (até 12 anos) e idosas (acima de 18 anos), que possuísem atividade ovariana normal e ausência de anormalidades no trato reprodutivo. Foram alimentadas diariamente com ração e feno e receberam sal mineral e água *ad libitum*. Inicialmente os animais foram acompanhados durante um ciclo estral para que as características individuais de cada um fossem observadas, como dinâmica do crescimento folicular, tamanho do folículo no momento da ovulação e comportamento do edema uterino. O acompanhamento foi realizado em 30 éguas, porém por diversos motivos nem todas conseguiram completar os três ciclos no período determinado. Sendo assim, foram selecionadas no total do experimento 23 éguas, sendo 12 éguas idosas e 11 éguas jovens.

### **4.2 Acompanhamento folicular, indução da ovulação e avaliação do folículo pré-ovulatório pelas características observadas ao Modo B e Doppler Colorido**

As éguas foram avaliadas através da ultrassonografia modo-B e Doppler-colorido utilizando o equipamento MyLab™Five (ESAOTE S.p.A. – Pie Medical, Itália) equipado com transdutor linear multifrequencial. Para o modo-B, brilho e contraste foram mantidos constantes ao longo de todo o estudo (Gastal 1998), na imagem Doppler, Pulse range velocity, ganho Doppler e filtro foram mantidos

constantes durante a colheita dos dados (Ginther, 2007). Os ciclos estrais de 23 éguas foram acompanhados por ultrassonografia modo-B diariamente até a observação de um folículo com aproximadamente 30mm. Após este momento os folículos passaram a ser acompanhados a cada 12h até a égua apresentar alto escore de edema uterino (entre 2 e 3), quando foi realizada a indução da ovulação. A partir de 32h após a indução, foram realizados exames a cada 4h horas até a detecção da ovulação, a fim de observar alterações foliculares momentos antes de ovular. Animais que não ovularam até 48h após a indução foram considerados como não responsivos ao tratamento. Foram realizados três ciclos consecutivos para cada uma das éguas sendo as induções da ovulação realizadas de forma aleatória sorteada previamente, um ciclo com 1.500 UI hCG, outro ciclo com 1mg de acetato de deslorelina (IM) e um outro ciclo com a associação dos dois agentes indutores.

As imagens obtidas com a ultrassonografia modo-B e Doppler colorido foram gravadas para análise posterior. Foram realizadas lentamente avaliando todas as porções dos folículos para que dados com relação ao folículo não fossem perdidos. Juntamente com as avaliações ultrassonográficas foram coletados dados de edema uterino e flutuação folicular para indução e período pré-ovulatório.

As avaliações ultrassonograficas dos folículos foram realizadas a cada quatro horas a partir de 32h até 48h após a indução da ovulação. Para a análise estatística foi necessária a padronização dos momentos. Sendo assim, foi fixado o momento da ovulação como sendo o momento 0 e os demais momentos retroativos a partir da ovulação, sendo -4h, -8h, -12h e -16h, que variou para cada égua na dependência do momento em que esta ovulou.

Doppler	Doppler	Doppler	Doppler	Doppler	Doppler
<b>Indução (M0)</b>	32h	36h	40h	44h	48h

Os tratamentos foram realizados em ordem aleatória sorteada previamente e foram nomeados como:

- Tratamento 1 – 1500UI hCG (IV)
- Tratamento 2 – 1mg de acetato de deslorelina (IM)
- Tratamento 3 – 1500UI hcg (IV) + 1mg de acetato de deslorelina (IM)

O hCG utilizado foi o produto Vetecor® (Laboratório Hertape Calier Saúde Animal S/A, Brasil). O acetato de deslorelina foi produzido no Laboratório do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da UNESP – Campus de Botucatu, Brasil.

A ecotextura ultrassonografica do endométrio foi acessada durante cada escaneamento e classificadas no momento da avaliação. Um sistema de escore de 0 a 3 (ecotextura uterina similar a diestro e alto grau de dobras uterinas, respectivamente) foi utilizado baseado na intensidade do edema (áreas anecóicas) e dobras uterinas. Escores fracionados (0,5; 1,5; 2,5) foram incluídos. Escores para edema uterino foram atribuídos sem referência ao escore do dia anterior. A flutuação folicular foi avaliada durante a palpação retal e classificada em escores de 0 a 3 (escores fracionados 0,5; 1,5; 2,5 foram incluídos). Para a avaliação das características foliculares, todos os momentos foram gravados para posterior análise.

### **4.3 Análise dos vídeos**

Os vídeos foram cuidadosamente analisados ao final do período de colheita dos dados. As imagens foram avaliadas pelo mesmo técnico, nas mesmas condições ambientais (computador, luz ambiente, local). Os arquivos foram apresentados sem que o examinador tivesse ciência do animal, ciclo ou momento avaliado, como descrito por Gastal et al. (1998). Cada momento apresentava cinco minutos de gravação dos quais foram avaliadas tanto as características ao modo-B quanto as características ao Doppler colorido.

Modo-B: Diâmetro folicular, formato do folículo, banda anecóica, espessura e ecogenicidade da camada de células da granulosa.

Doppler colorido: Vascularização folicular e intensidade das cores.

- **Diâmetro folicular**

O tamanho do folículo foi avaliado nas imagens gravadas em um momento estático. O diâmetro foi obtido da média entre altura e largura do antro na aparente área máxima do folículo (Gastal et al., 1998). A avaliação do diâmetro folicular está representada na figura 2.

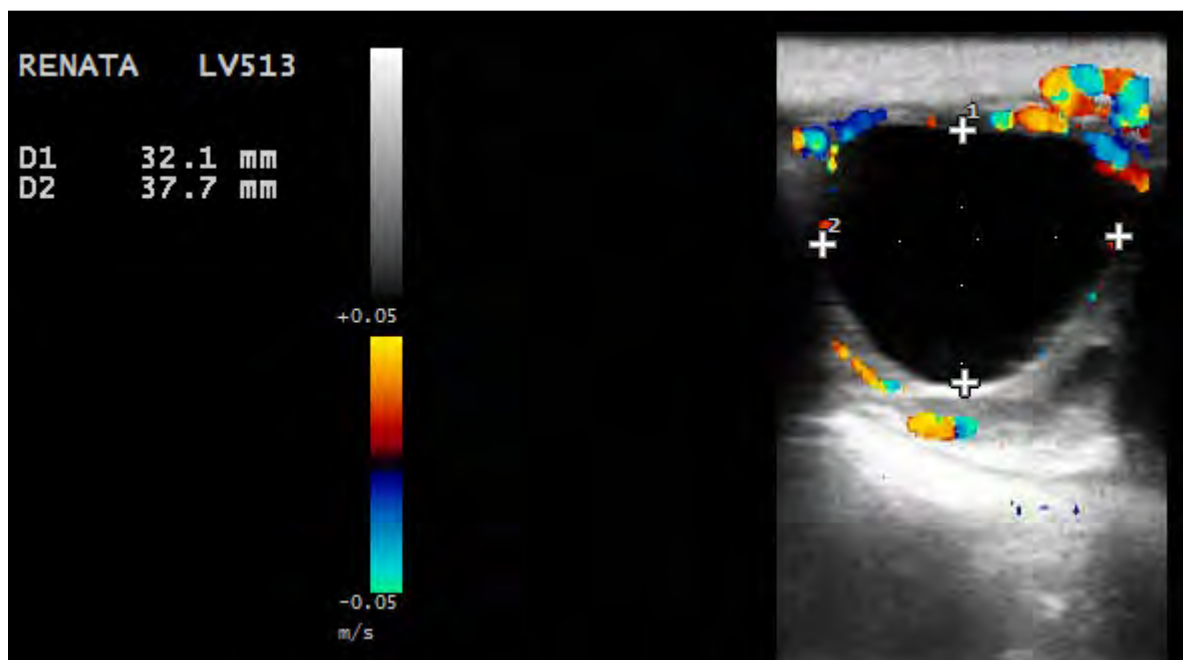


Figura 2. Imagem ultrassonográfica de folículo pré-ovulatório equino 32 horas após indução da ovulação. Diâmetro avaliado pela média de duas aferições, altura e largura (medidas apresentadas à esquerda na imagem).

- **Formato do folículo**

O formato do folículo foi classificado de duas formas, regular e irregular, de acordo com a imagem ao ultrassom. Folículos regulares apresentam formato esférico ou oval, porém com o contorno regular. Folículos irregulares apresentam formatos distintos com contorno tortuoso (Gastal et al., 1998). A figura 3 apresenta imagens que exemplificam o formato do folículo.

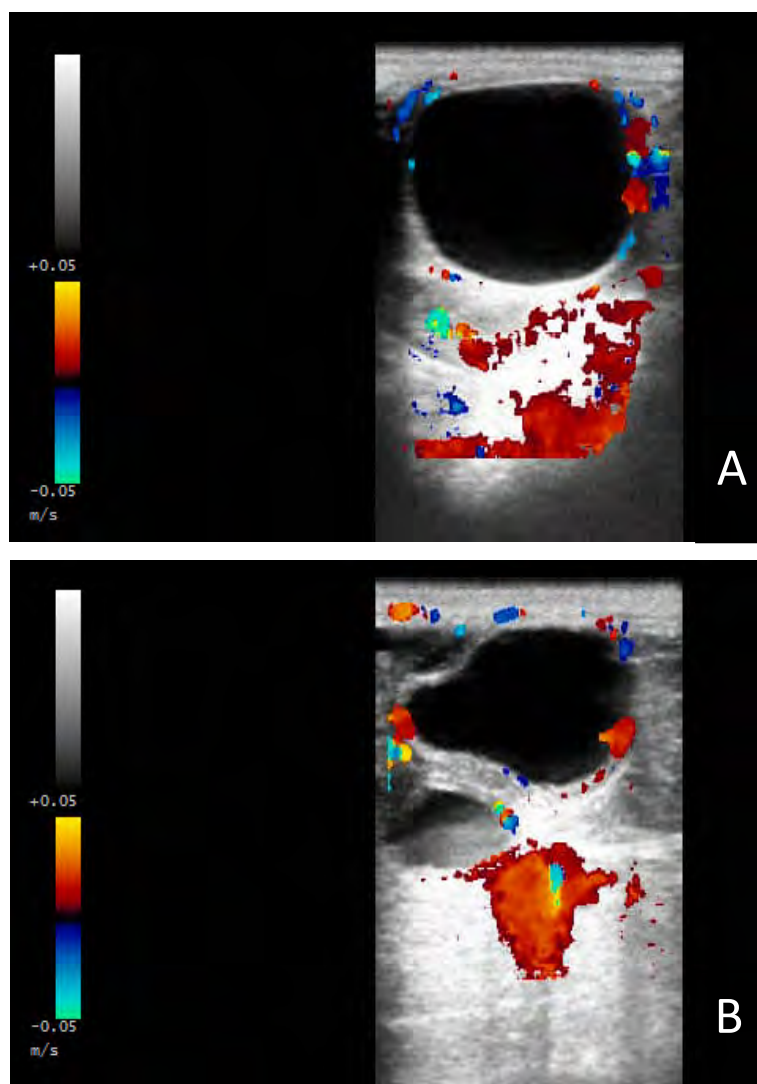


Figura 3. Imagens ultrassonograficas de folículos equinos no momento pré-ovulatório, após indução da ovulação. (A) Folículo apresentando formato regular, (B) Classificação do folículo em formato irregular.



- **Banda anecóica**

A banda anecóica é representada na imagem do ultrassom como uma linha pouco ecogênica que circunda a borda do folículo (Gastal et al., 1998). Foi avaliada subjetivamente de acordo com a porcentagem estimada do contorno folicular apresentando a faixa anecóica. Na figura 4, exemplo de folículo apresentando banda anecóica.

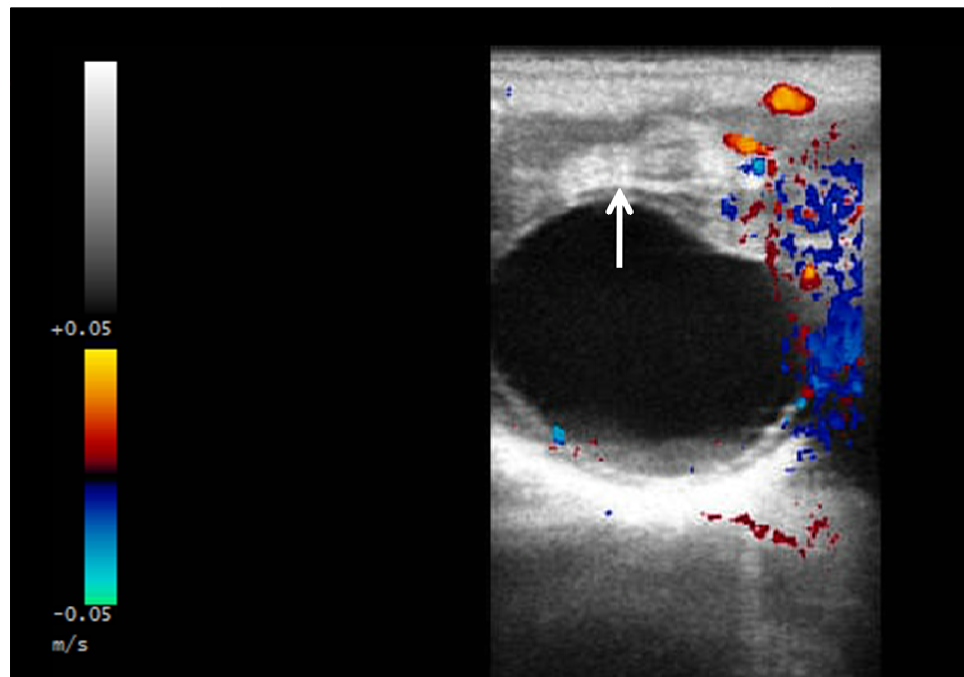


Figura 4. Imagem ultrassonográfica de folículo equino no período pré-ovulatório apresentando 80% de banda anecóica ao redor da circunferência folicular (seta).

- **Espessura da camada de células da granulosa**

A espessura da camada de células da granulosa foi mensurada em cada folículo utilizando a função do aparelho de ultrassonografia que mede distâncias. É representada na imagem pela camada ecogênica presente entre a banda anecóica e o fluido folicular (menos ecogênico) (Gastal et al., 1998). Na figura 5, a representação da espessura da camada de células da granulosa.

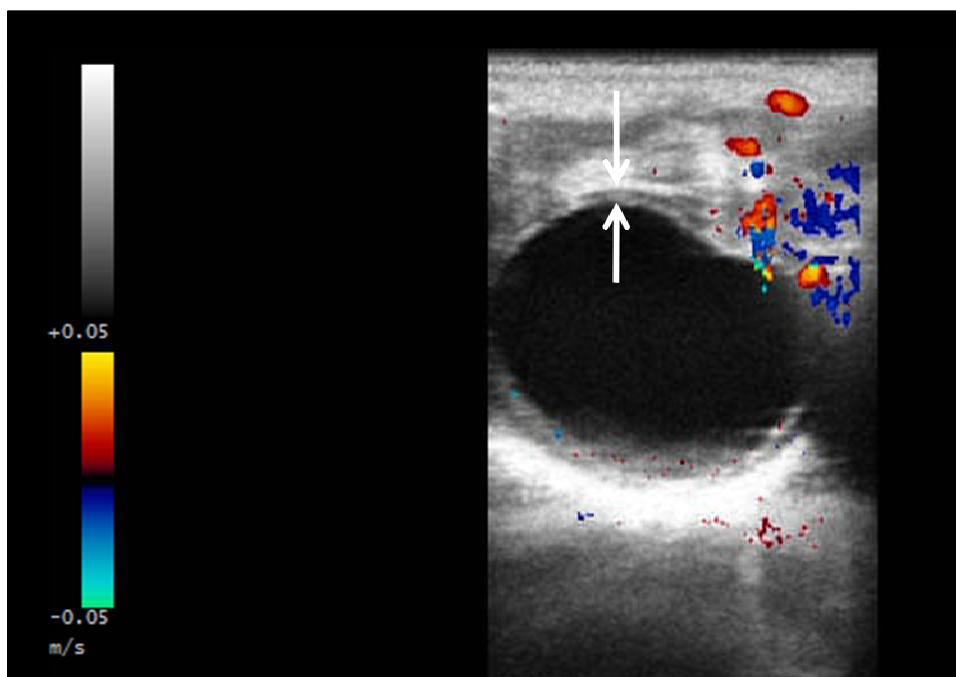


Figura 5. Imagem ultrassonográfica de folículo equino no momento pré-ovulatório, após indução da ovulação. Entre as setas, a imagem da camada de células da granulosa (distância entre o fluido folicular e a banda anecóica).

- **Ecogenicidade da camada de células da granulosa**

A ecogenicidade da camada de células da granulosa foi avaliada subjetivamente com escores de 1 a 3, sendo 1 pouco ecogênica (anecóica e cinza escuro) e 3 muito ecogênica (branca), e está exemplificada na figura 6 (Gastal et al., 1998).

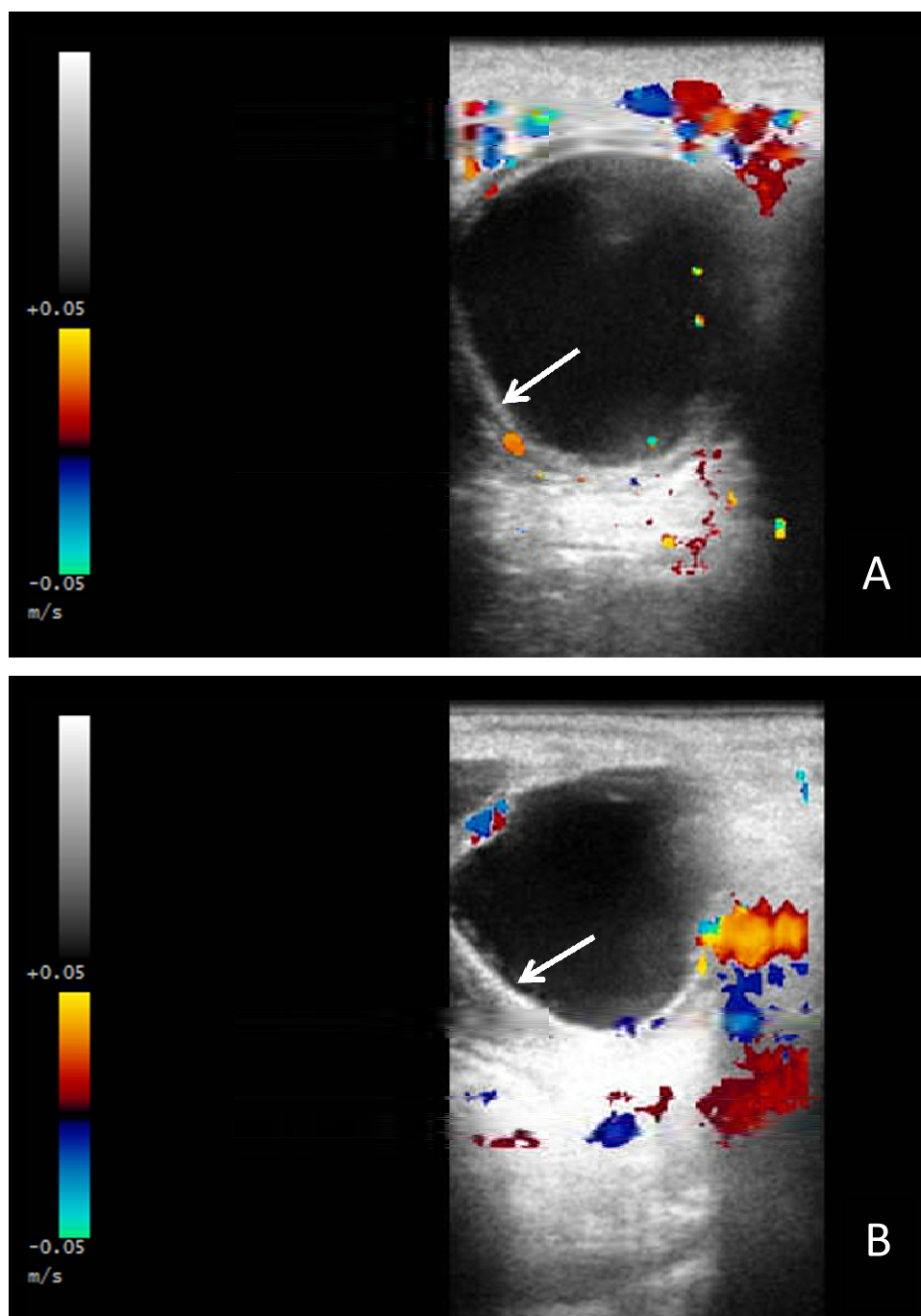


Figura 6. Imagens ultrassonograficas de folículos equinos no período pré-ovulatório, após indução da ovulação. (A) Folículo apresentando baixa ecogenicidade da camada de células da granulosa (seta, escore=1). (B) Folículo apresentando ecogenicidade alta da camada de células da granulosa (seta, escore=3).

- **Vascularização folicular**

A vascularização folicular foi estimada de forma subjetiva, de acordo com a porcentagem da parede folicular total apresentando sinais coloridos (Ginther, 2007). Exemplos de folículos pouco e muito vascularizados estão apresentados na figura 7.

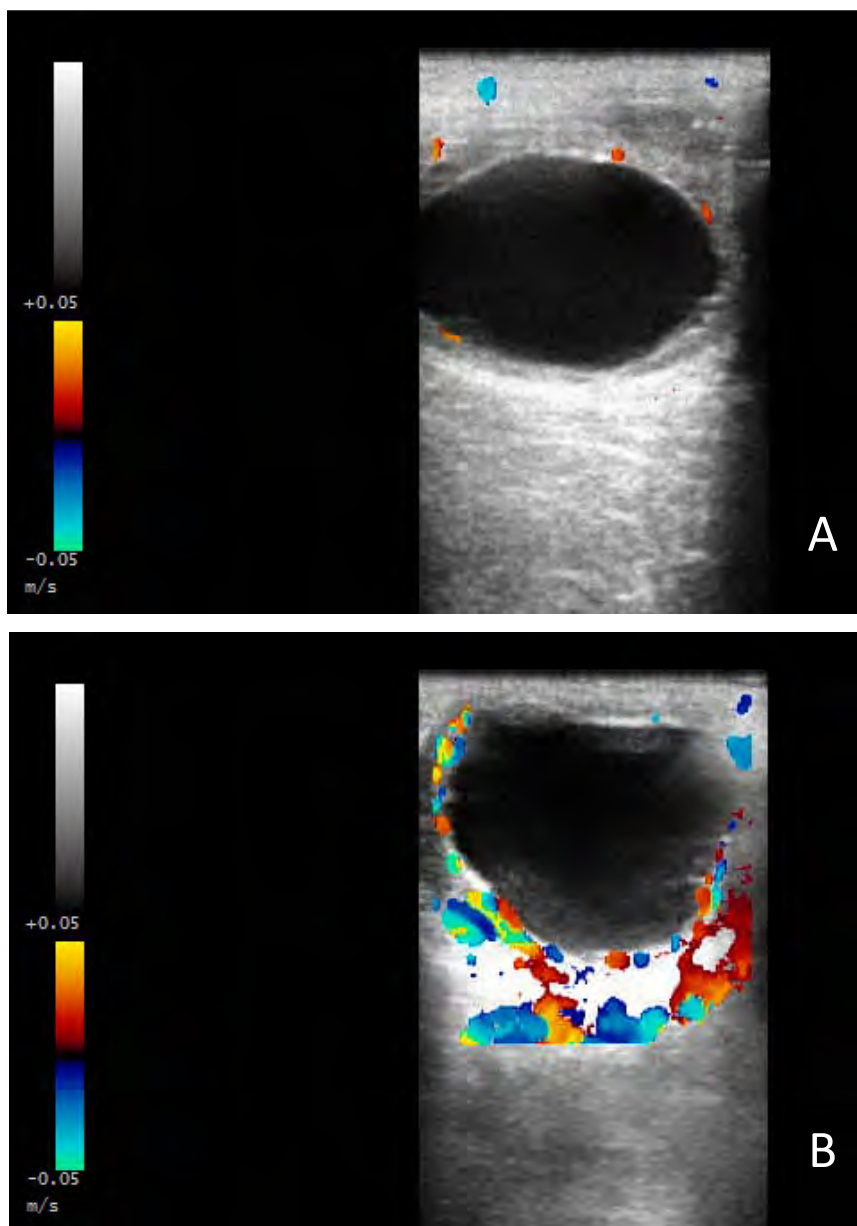


Figura 7. Imagem da ultrassonografia Doppler-colorido de folículos equinos no momento pré-ovulatório, após indução da ovulação. (A) Vascularização folicular baixa (<10% da circunferência folicular). (B) Vascularização folicular alta (70% da circunferência folicular).

- **Variação da Intensidade das cores da parede folicular**

A intensidade das cores foi avaliada subjetivamente e classificada de 1-4 sendo 4=Alta e 1=Baixa. Na barra lateral (legenda de cores) a intensidade baixa fica ao centro e a alta nas extremidades (Ginther, 2007). A figura 8 demonstra a variação na intensidade das cores da vascularização da parede folicular.

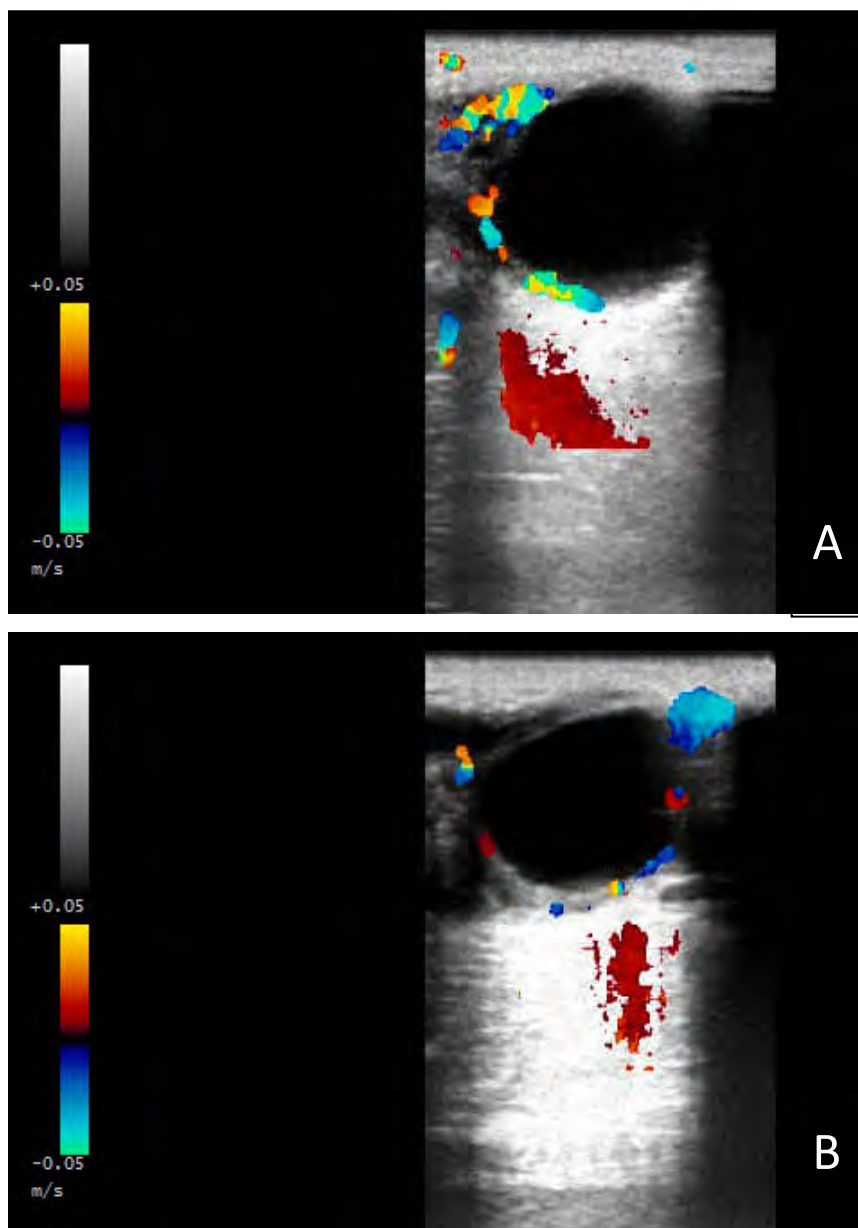


Figura 8. Imagem da ultrassonografia Doppler-colorido de folículos equinos no período pré-ovulatório, após indução da ovulação. (A) Intensidade das cores alta (escore=3) e (B) Intensidade das cores baixa (escore=1).

#### 4.5 Análise Estatística

Os ciclos em que as éguas não responderam ao tratamento para indução da ovulação foram retirados da análise estatística.

Modelos lineares de medidas repetidas (PROC MIXED, SAS Institute, 2009) foram usados para comparar a média das variáveis-resposta (Diâmetro folicular, banda anecóica, espessura e ecogenicidade da camada de células da granulosa, vascularização folicular e intensidade das cores) entre os momentos de coleta, tratamentos e idades. Um termo para testar a interação entre tempo e tratamento foi incluído em todos os modelos e permaneceu quando foi significativo. O teste de Qui-quadrado (PROC FREQ, SAS Institute, 2009) foi usado para avaliar a associação entre a morfologia folicular (regular ou irregular) e o momento de coleta. O nível de significância estatística foi definido em 0,05 para todas as análises.

O teste da Soma de Postos de Wilcoxon foi usado para comparar o escore de edema entre as duas categorias de idade estudadas. O teste de Kruskal Wallis foi usado para comparar o escore de edema entre tratamentos. O teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon para amostras pareadas (Pagano e Gauvreau, 2000) foi usado para comparar o escore de edema uterino entre o momento “indução” e cada momento estudado. O método de Bonferroni (Kleinbaum et al., 2007) foi usado para ajustar o valor-P resultante das comparações múltiplas. A análise estatística foi realizada com os procedimentos PROC UNIVARIATE e PROC NPAR1WAY (SAS Institute, 2009) e significância estatística foi definida como  $P < 0.05$ .

*Resultados*

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Intervalo entre tratamento e observação da ovulação

Éguas jovens apresentaram intervalo entre tratamento e ovulação de  $38,7 \pm 1,1$ ,  $42,8 \pm 1,0$  e  $38,0 \pm 1,0$  horas em ciclos tratados com hCG, acetato de deslorelina (Des) e acetato de deslorelina associada a hCG (Des + hCG), respectivamente. O intervalo entre tratamento e ovulação foi significativamente mais longo quando tratadas com acetato de deslorelina ( $P=0,0764$ ). Em éguas idosas o intervalo entre tratamento e ovulação observado foi  $44,0 \pm 1,6$  horas no ciclo hCG,  $41,3 \pm 0,9$  horas no ciclo Des e  $40,0 \pm 0,9$  horas no ciclo Des + hCG, porém não diferiram estatisticamente ( $P>0,05$ ). Éguas jovens responderam mais rápido ao tratamento com hCG que éguas idosas ( $P=0,0833$ ). Houve interação entre tratamento e categoria animal ( $P=0,0186$ ). Os dados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Intervalo (horas) entre indução e observação da ovulação de éguas jovens e idosas após tratamentos para indução da ovulação.

	<b>hCG</b>	<b>Des</b>	<b>Des + hCG</b>
<b>Jovens</b>	$38,7 \pm 1,1$ aA	$42,8 \pm 1,0$ b	$38,0 \pm 1,0$ a
<b>Idosas</b>	$44,0 \pm 1,6$ B	$41,3 \pm 0,9$	$40,0 \pm 0,9$

ab Letras minúsculas diferem na linha; AB Letras maiúsculas diferem na coluna

hCG=10 jovens e 4 idosas, acetato de deslorelina Des e hCG + Des 11 jovens e 12 idosas.



## 5.2 Características foliculares observadas através de ultrassonografia modo-B

- **Dinâmica do crescimento folicular**

A média do diâmetro folicular em todos os ciclos avaliados no momento da indução (n=60) foi  $33,49 \pm 0,38$ mm. Apesar de não ter sido encontrada diferença estatística entre os momentos ( $P > 0,01$ ), foi detectado um aumento numérico no diâmetro no momento 16 horas antes da ovulação ( $34,83 \pm 0,90$ mm/ n=8), mantendo valor aproximado no momento seguinte (12 horas antes da ovulação/ n=14),  $34,93 \pm 0,83$ mm. Nas 8 horas que precederam a ovulação (n=50), a média do diâmetro apresentou uma pequena diminuição numérica para  $34,05 \pm 0,60$ mm, diminuindo para  $33,77 \pm 0,47$ mm no momento mais próximo da ovulação (-4 horas/ n=60). A dinâmica de desenvolvimento folicular médio está representado na figura 9.

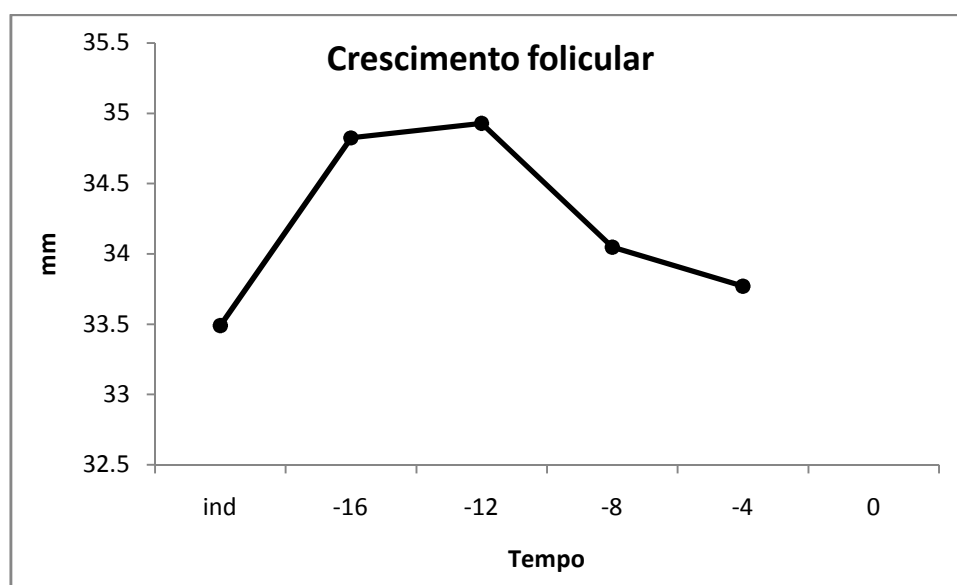


Figura 9. Diâmetro folicular médio (mm) em todos os ciclos avaliados, nos momentos ind (indução da ovulação), 16, 12, 8 e 4 horas antes da ovulação (0 hora).

Foram observados valores similares de diâmetro folicular entre éguas jovens e idosas em todos os momentos ( $P>0,05$ ). Éguas jovens apresentaram  $33,61\pm 0,50\text{mm}$  (indução,  $n=32$ ),  $34,68\pm 3,88\text{mm}$  (-16 horas,  $n=2$ ),  $35,93\pm 0,95\text{mm}$  (-12 horas,  $n=5$ ),  $33,94\pm 1,01\text{mm}$  (-8 horas,  $n=23$ ) e  $34,27\pm 0,58\text{mm}$  (-4 horas,  $n=32$ ). Para éguas idosas os valores foram  $33,35\pm 0,59\text{mm}$  (indução,  $n=28$ ),  $34,88\pm 0,72\text{mm}$  (-16 horas,  $n=6$ ),  $34,37\pm 1,18\text{mm}$  (-12 horas,  $n=9$ ),  $34,14\pm 0,74\text{mm}$  (-8 horas,  $n=27$ ) e  $33,25\pm 0,74\text{mm}$  (-4 horas,  $n=28$ ). As médias do desenvolvimento folicular observado nas duas faixas etárias estão representadas na figura 10.

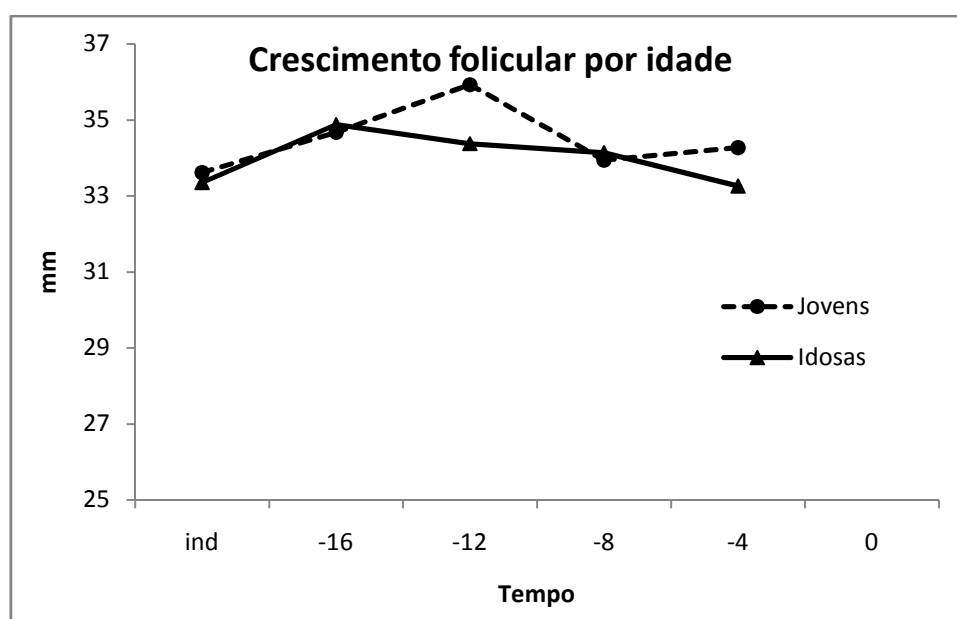


Figura 10. Diâmetro folicular de éguas jovens (até 12 anos) e éguas idosas ( $\geq 18$  anos) nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas.

A taxa de desenvolvimento folicular após os tratamentos não foi diferente em nenhum momento avaliado ( $P>0,05$ ). Os diâmetros foliculares no tratamento 1 (hCG) foram  $34,82\pm 0,82$ mm (indução,  $n=14$ ),  $34,9\pm 0,97$ mm (-16 horas,  $n=4$ ),  $37,19\pm 1,06$ mm (-12 horas,  $n=5$ ),  $34,9\pm 1,06$ mm (-8 horas,  $n=11$ ) e  $34,28\pm 0,82$ mm (-4 horas,  $n=14$ ). No tratamento 2 (acetato de desloreline) os diâmetros obtidos foram  $32,66\pm 0,61$ mm (indução,  $n=23$ ),  $34,75\pm 1,69$ mm (-16 horas,  $n=4$ ),  $34,14\pm 1,11$ mm (-12 horas,  $n=7$ ),  $34,42\pm 0,87$ mm (-8 horas,  $n=23$ ) e  $33,53\pm 0,91$ mm (-4 horas,  $n=23$ ). No tratamento 3 (acetato de desloreline + hCG) os valores observados foram de  $33,52\pm 0,57$ mm (indução,  $n=23$ ),  $32,05\pm 1,55$  (-12 horas,  $n=2$ ),  $32,92\pm 1,22$ mm (-8 horas,  $n=16$ ) e  $33,65\pm 0,71$ mm (-4 horas,  $n=23$ ). No tratamento 3, todas as éguas ovularam até o momento 44 horas. Neste caso, o momento 16 horas antes da ovulação (28 horas) não foi avaliado e, portanto, não está representado no gráfico. A curva de crescimento folicular para cada tratamento está apresentada na figura 11.

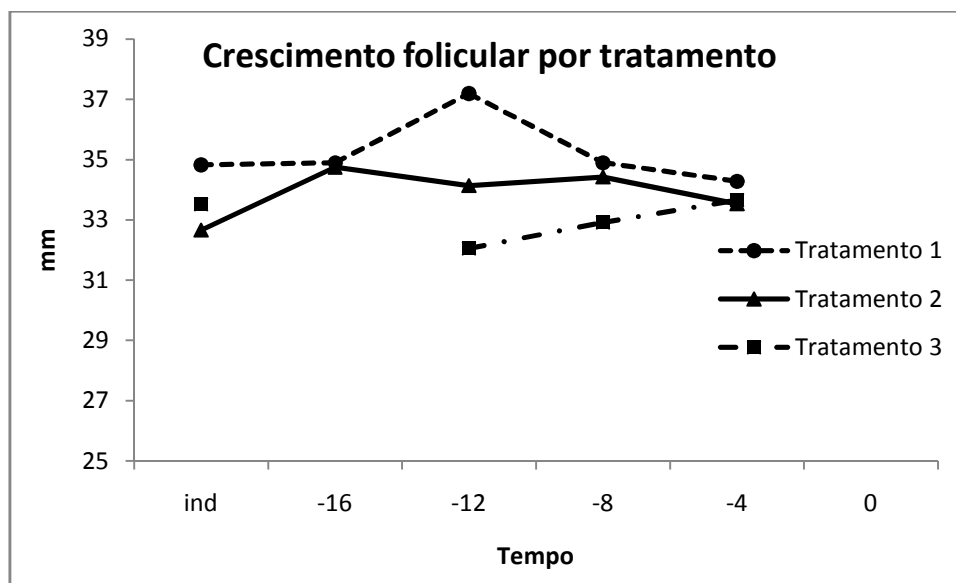


Figura 11. Diâmetro folicular nos momentos ind (indução da ovulação), 16, 12, 8 e 4 horas antes da ovulação (hora 0) para tratamento 1 (hCG), tratamento 2 (acetato de desloreline) e tratamento 3 (hCG + acetato de desloreline).

- **Alterações no formato do folículo pré-ovulatório**

O formato do folículo variou entre as avaliações ( $P < 0,0001$ ). No momento da indução da ovulação e 16 horas antes da ovulação e 100% dos folículos apresentavam-se com formato regular. No momento seguinte (-12 horas), 78,57% dos folículos ainda possuíam formato regular, diminuindo para 57,14% 8 horas antes da ovulação. No último momento avaliado (-4 horas) houve uma inversão e o percentual de folículos com contorno irregular passou para 73,77% do total de folículos avaliados.

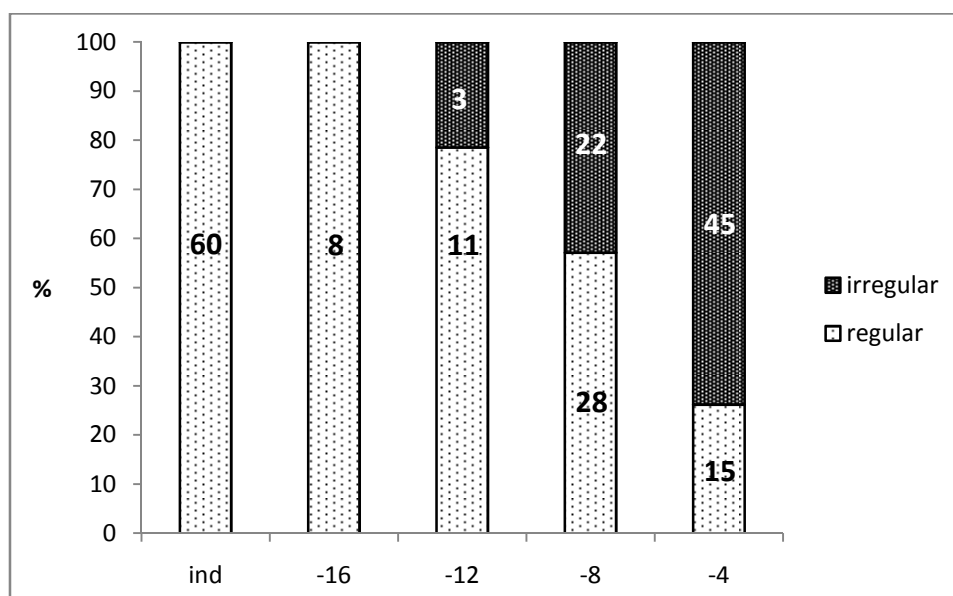


Figura 12. Relação entre formato regular e irregular dos folículos nos momentos ind (indução), 16, 12, 8 e 4 horas antes da ovulação.

- **Banda anecóica observada na parede folicular**

A porcentagem da circunferência folicular apresentando banda anecóica variou entre os momentos e foi diferente entre ind (indução) e -4 horas ( $P < 0,01$ ). Os valores obtidos foram  $34,76 \pm 1,57\%$  (ind,  $n=60$ ),  $43,33 \pm 5,58\%$  (-16 horas,  $n=8$ ),  $43,33 \pm 5,27\%$  (-12 horas,  $n=14$ ),  $44,85 \pm 2,72\%$  (-8 horas,  $n=50$ ), tendo sido observado o valor máximo no momento -4 horas ( $51,28 \pm 2,52\%$ ,  $n=60$ ).

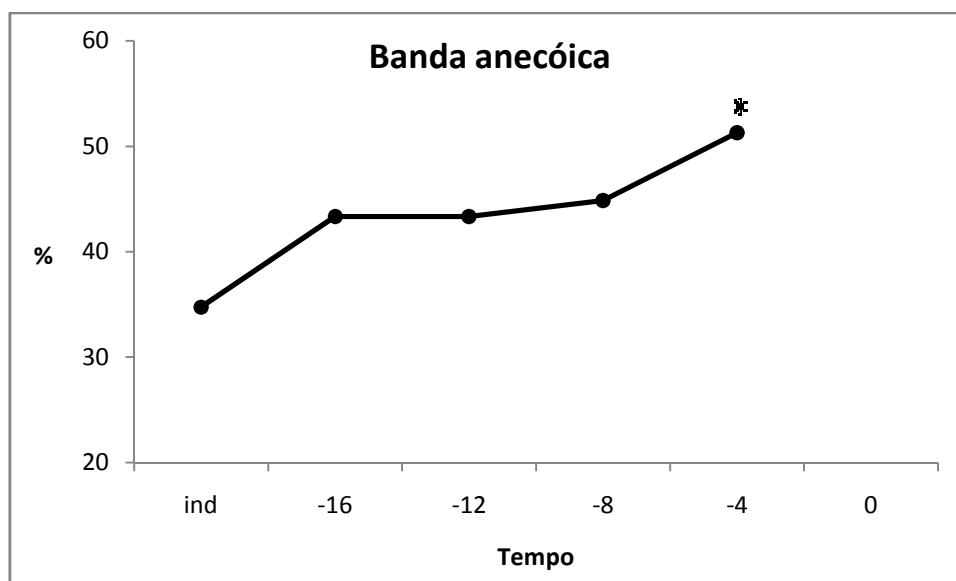


Figura 13. Porcentagem de banda anecóica na circunferência folicular nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas. (0=ovulação). Aumento significativo ( $P < 0,05$ ) na banda anecóica em relação ao momento da indução é indicado por asterisco (\*).

Éguas jovens e éguas idosas apresentaram valores similares de porcentagem da circunferência folicular apresentando banda anecóica ( $P>0,05$ ). Para éguas jovens as porcentagens foram  $32,86\pm 2,2\%$  (indução,  $n=32$ ),  $40\%$  (-16 horas,  $n=2$ ),  $47,5\pm 2,5\%$  (-12 horas,  $n=5$ ),  $45,33\pm 3,89\%$  (-8 horas,  $n=23$ ) e  $52,22\pm 4,01\%$  (-4 horas,  $n=32$ ). Éguas idosas apresentaram  $36,66\pm 2,22\%$  (indução,  $n=28$ ),  $45\pm 8,66\%$  (-16 horas,  $n=6$ ),  $41,25\pm 7,89\%$  (-12 horas,  $n=9$ ),  $44,44\pm 3,9\%$  (-8 horas,  $n=27$ ) e  $50,48\pm 3,27\%$  (-4 horas,  $n=28$ ) da circunferência folicular apresentando banda anecóica. Os valores encontrados em cada faixa etária estão representados na figura 14.

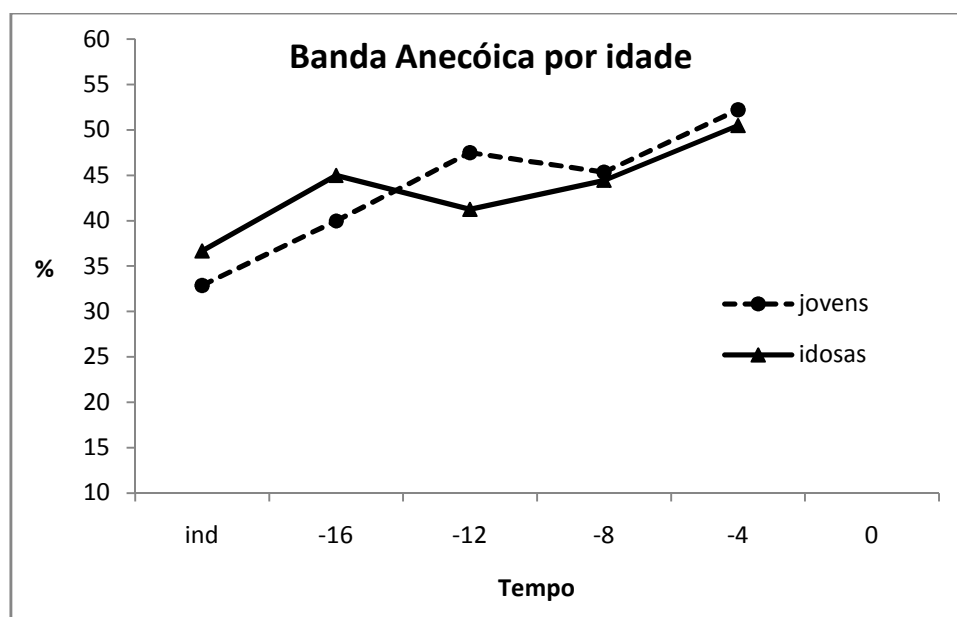


Figura 14. Porcentagem do folículo apresentando banda anecóica de acordo com a idade das éguas nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas antes da ovulação (0).

Os três tratamentos produziram valores similares para a porcentagem da circunferência folicular apresentando banda anecóica, não havendo diferença estatística entre eles ( $P>0,05$ ). Folículos induzidos a ovular com hCG (Tratamento 1) apresentaram  $34,44\pm 1,76\%$  (indução,  $n=14$ ),  $40\pm 10\%$  (-16 horas,  $n=4$ ),  $30\pm 7,07\%$  (-12 horas,  $n=5$ ),  $45,71\pm 5,71\%$  (-8 horas,  $n=11$ ) e  $40\pm 4,36\%$  (-4 horas,  $n=14$ ). Os valores no tratamento 2 (acetato de deslorelina) foram  $38,13\pm 2,45\%$  (indução,  $n=23$ ),  $46,67\pm 6,67\%$  (-16 horas,  $n=4$ ),  $48,33\pm 4,77\%$  (-12 horas,  $n=7$ ),  $46,67\pm 5,23\%$  (-8 horas,  $n=23$ ) e  $56,47\pm 3,53\%$  (-4 horas,  $n=23$ ). No tratamento 3 (hCG + acetato de deslorelina) os valores encontrados foram  $31,76\pm 2,87$  (indução,  $n=23$ ),  $55\pm 25\%$  (-12 horas,  $n=2$ ),  $41,82\pm 2,2\%$  (-8 horas,  $n=16$ ) e  $50,67\pm 4,31\%$  (-4 horas,  $n=23$ ). No tratamento 3, todas as éguas ovularam até o momento 44 horas. Neste caso, o momento 16 horas antes da ovulação (28 horas) não foi avaliado e, portanto, não está representado no gráfico. A porcentagem de banda anecóica observada em cada tratamento está representada na figura 15.

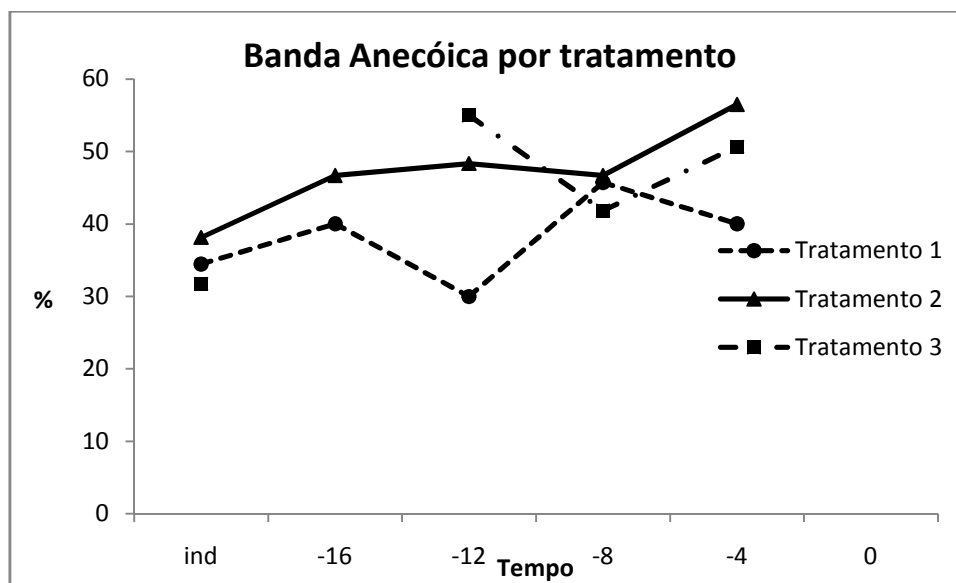


Figura 15. Porcentagem da parede folicular apresentando banda anecóica de acordo com o tratamento nos momentos ind (indução), -16, -12, 18 e -4 horas. Tratamento 1 (hCG), Tratamento 2 (acetato de deslorelina) e tratamento 3 (hCG + acetato de deslorelina).

- **Alterações na espessura da camada de células da granulosa**

A espessura da camada de células da granulosa variou numericamente entre os momentos e apresentou diferença estatística entre os momentos ind (indução) e -8 horas ( $P < 0,01$ ) e entre os momentos ind (indução) e -4 horas ( $p < 0,01$ ). A variação na espessura da camada de células da granulosa está representada na figura 16. Os valores obtidos foram  $1,39 \pm 0,05$  mm (indução,  $n=60$ ),  $1,58 \pm 0,11$  mm (-16 horas,  $n=8$ ),  $1,61 \pm 0,12$  mm (-12 horas,  $n=14$ ),  $1,81 \pm 0,07$  mm (-8 horas,  $n=50$ ) e  $1,95 \pm 0,07$  mm (-4 horas,  $n=60$ ).

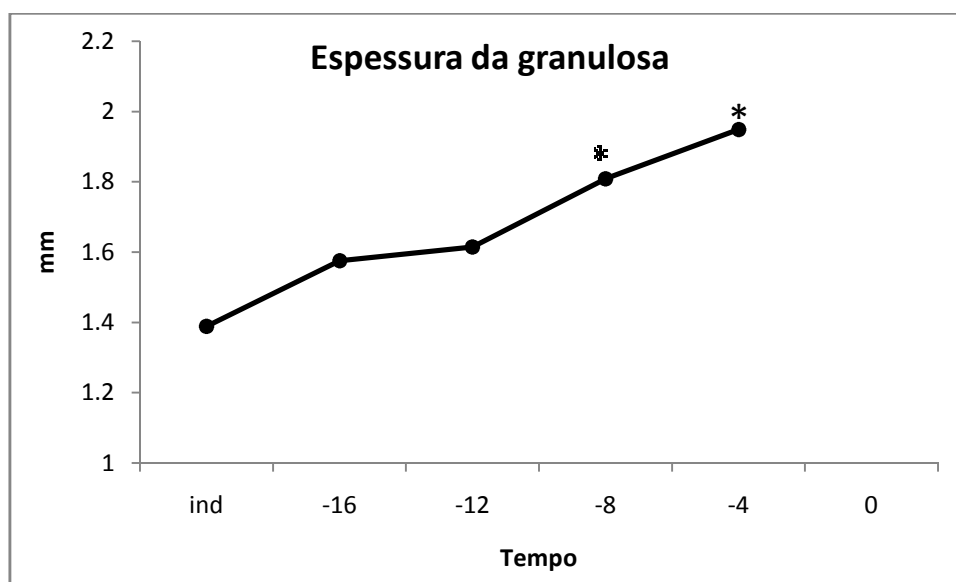


Figura 16. Espessura média da camada de células da granulosa em todos os ciclos avaliados, nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (0= ovulação). Aumentos significativos ( $P < 0,05$ ) na espessura da camada de células da granulosa em relação ao momento da indução são indicados por asterisco (\*).



A espessura da camada de células da granulosa não diferiu estatisticamente entre éguas jovens e idosas ( $P>0,01$ ). Em éguas jovens, os valores observados foram  $1,26\pm 0,05\text{mm}$  (indução,  $n=32$ ),  $1,55\pm 0,15\text{mm}$  (-16 horas,  $n=2$ ),  $1,78\pm 0,24\text{mm}$  (-12 horas,  $n=5$ ),  $1,77\pm 0,09\text{mm}$  (-8 horas,  $n=23$ ) e  $1,89\pm 0,1\text{mm}$  (-4 horas,  $n=32$ ). Para éguas idosas os valores obtidos foram  $1,54\pm 0,06\text{mm}$  (indução,  $n=28$ ),  $1,58\pm 0,14\text{mm}$  (-16 horas,  $n=6$ ),  $1,52\pm 0,14\text{mm}$  (-12 horas,  $n=9$ ),  $1,84\pm 0,09\text{mm}$  (-8 horas,  $n=27$ ) e  $2,0\pm 0,09\text{mm}$  (-4 horas,  $n=28$ ). A espessura da camada de células da granulosa para as faixas etárias está representada na figura 17.

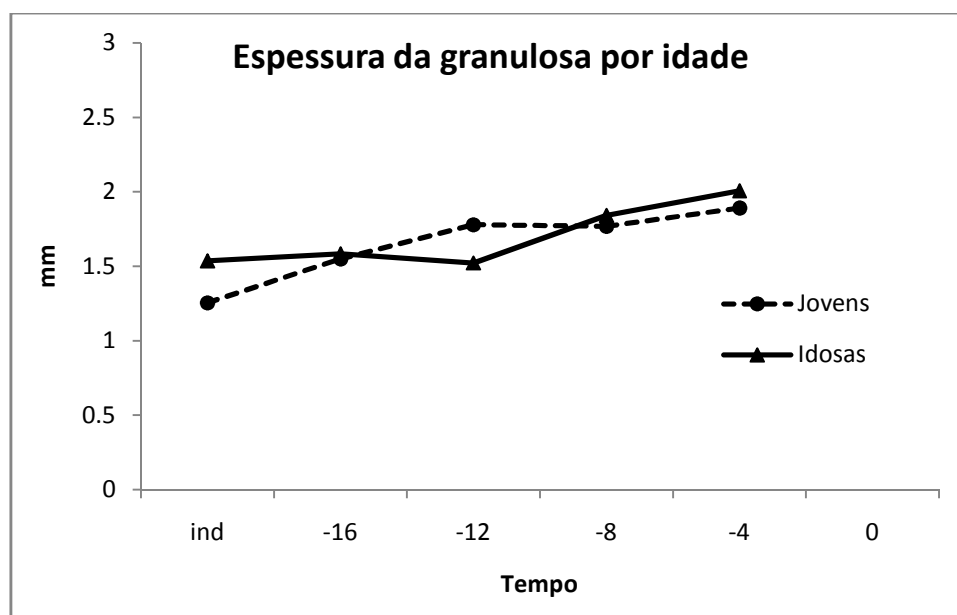


Figura 17. Espessura média da camada de células da granulosa de éguas jovens e éguas idosas nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (0=ovulação).

A avaliação da espessura da camada de células da granulosa de acordo com o tratamentos apresentou diferença estatística em ciclos que utilizaram o tratamento 2 (acetato de deslorelina) entre os momentos ind (indução) e -4 horas ( $P=0,013$ ) e tratamento 3 (acetato de deslorelina + hCG) nos momentos ind e -4 ( $P=0,0003$ ). Não houve diferença estatística entre os momentos do tratamento 1 (hCG). Os valores observados no tratamento 1 foram  $1,41\pm0,08\text{mm}$  (indução,  $n=14$ ),  $1,65\pm0,12\text{mm}$  (-16 horas,  $n=4$ ),  $1,72\pm0,26\text{mm}$  (-12 horas,  $n=5$ ),  $1,87\pm0,12\text{mm}$  (-8 horas,  $n=11$ ) e  $1,91\pm0,13\text{mm}$  (-4 horas,  $n=14$ ). Os valores obtidos com o tratamento 2 foram  $1,46\pm0,09\text{mm}$  (indução,  $n=23$ ),  $1,5\pm0,2\text{mm}$  (-16 horas,  $n=4$ ),  $1,57\pm0,17\text{mm}$  (-12 horas,  $n=7$ ),  $1,84\pm0,12\text{mm}$  (-8 horas,  $n=23$ ) e  $2,0\pm0,13\text{mm}$  (-4 horas,  $n=23$ ). No tratamento 3 os valores observados da espessura da camada de células da granulosa foram  $1,31\pm0,07\text{mm}$  (indução,  $n=23$ ),  $1,5\pm0,1\text{mm}$  (-12 horas,  $n=2$ ),  $1,73\pm0,1\text{mm}$  (-8 horas,  $n=16$ ) e  $1,93\pm0,11\text{mm}$  (-4 horas,  $n=23$ ). No tratamento 3, todas as éguas ovularam até o momento 44 horas. Neste caso, o momento 16 horas antes da ovulação (28 horas) não foi avaliado e, portanto, não está representado no gráfico. Os valores de espessura da camada de células da granulosa estão representados na figura 18.

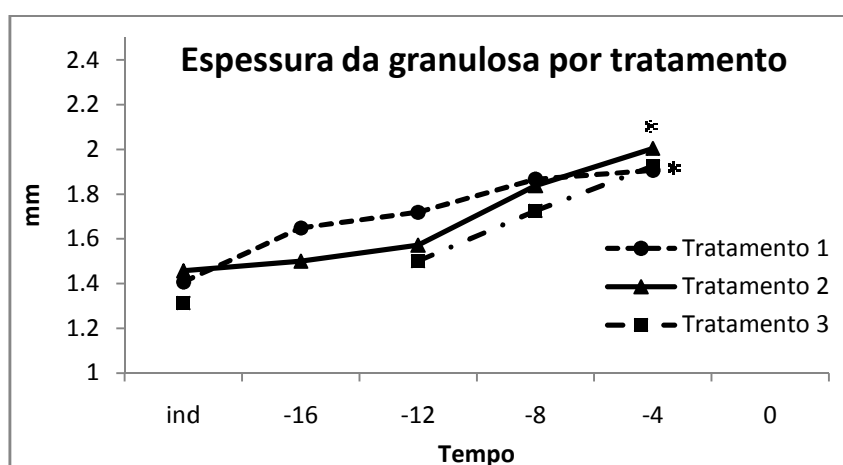


Figura 18. Espessura média da camada de células da granulosa observadas no tratamento 1 (hCG), tratamento 2 (acetato de deslorelina) e tratamento 3 (hCG + acetato de deslorelina) os momentos ind (indução), -16, -12, -8, -4 horas (ovulação=0). Aumento significativo ( $P<0,05$ ) na espessura da camada de células da granulosa com relação ao momento da indução da ovulação é indicado por asterisco (\*; tratamentos 2 e 3).

- **Alterações na ecogenicidade da camada de células da granulosa**

Valores de escores da ecogenicidade da camada de células da granulosa não diferiram estatisticamente ( $P>0,05$ ). A variação numérica dos escores obtidos da camada de células da granulosa está expressa na figura 19. Os valores observados foram  $2,02\pm 0,08$  (indução,  $n=60$ ),  $2,13\pm 0,13$  (-16 horas,  $n=8$ ),  $2,5\pm 0,18$  (-12 horas,  $n=14$ ),  $2,20\pm 0,09$  (-8 horas,  $n=50$ ) e  $2,38\pm 0,07$  (-4 horas,  $n=60$ ). Os dados estão representados na figura 19.

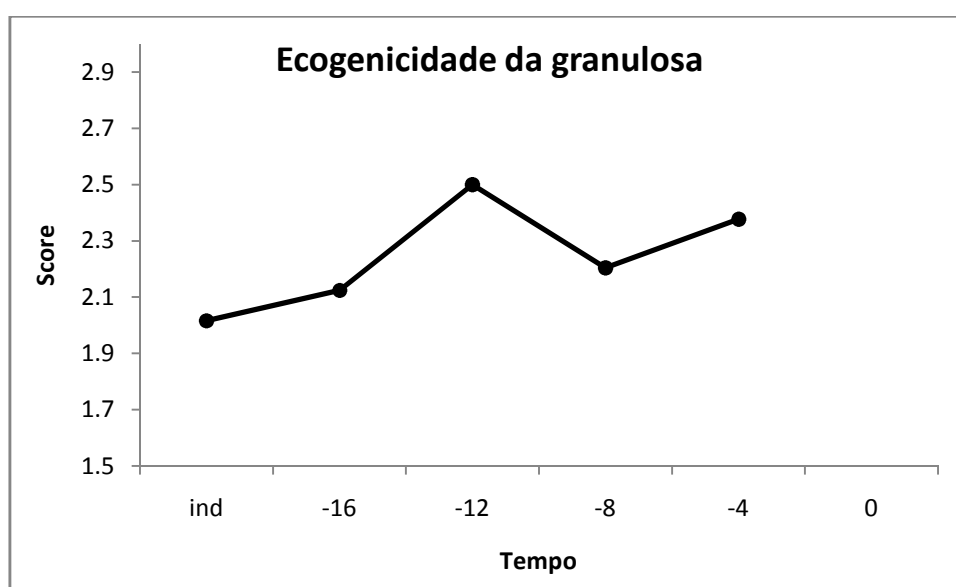


Figura 19. Escores médios da ecogenicidade da camada de células da granulosa em todos os ciclos avaliados, nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0).

Os valores obtidos de ecogenicidade da camada de células da granulosa na imagem ultrassonográfica de folículos de éguas jovens (até 12 anos) e idosas ( $\geq 18$  anos) não diferiram significativamente. Os escores médios de éguas jovens foram  $1,94 \pm 0,1$  (indução,  $n=32$ ),  $2,0$  (-16 horas,  $n=2$ ),  $2,6 \pm 0,4$  (-12 horas,  $n=5$ ),  $2,27 \pm 0,1$  (-8 horas,  $n=23$ ) e  $2,42 \pm 0,1$  (-4 horas,  $n=32$ ). Escores médios encontrados para éguas idosas foram  $2,11 \pm 0,13$  (indução,  $n=28$ ),  $2,17 \pm 0,17$  (-16 horas,  $n=6$ ),  $2,44 \pm 0,18$  (-12 horas,  $n=9$ ),  $2,15 \pm 0,14$  (-8 horas,  $n=27$ ) e  $2,33 \pm 0,11$  (-4 horas,  $n=28$ ). Os valores obtidos em cada momento para cada faixa de idade estão representados na figura 20.

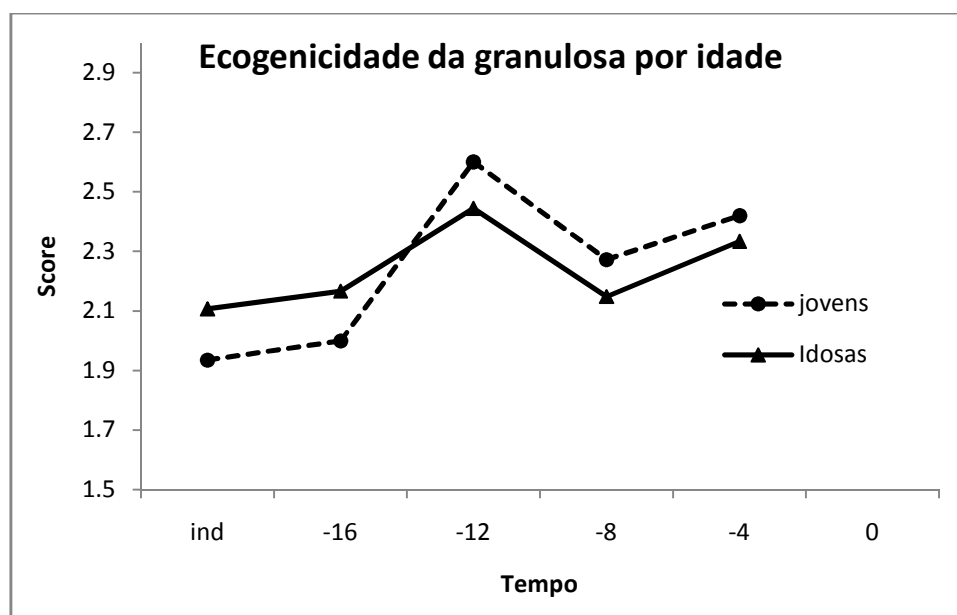


Figura 20. Escores médios de ecogenicidade da camada da de células da granulosa obtidas na imagem ultrassonografica nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0) para éguas jovens (até 12 anos) e idosas ( $\geq 18$  anos).

Os escores de ecogenicidade da camada de células da granulosa para os três tratamentos variaram numericamente durante os momentos, porém sem significância estatística. Os valores obtidos no tratamento 1 (hCG) foram  $2,07 \pm 0,12$  (indução, n=14),  $2,25 \pm 0,25$  (-16 horas, n=4),  $2,8 \pm 0,2$  (-12 horas, n=5),  $2,5 \pm 0,19$  (-8 horas, n=11) e  $2,5 \pm 0,16$  (-4 horas, n=14). Valores encontrados no tratamento 2 (acetato de deslorelina) foram  $2,05 \pm 0,15$  (indução, n=23),  $2,0$  (-16 horas, n=4),  $2,43 \pm 0,3$  (-12 horas, n=7),  $2,0 \pm 0,12$  (-8 horas, n=23) e  $2,18 \pm 0,11$  (-4 horas, n=23). Escores médios observados no tratamento 3 (acetato de deslorelina + hCG) foram  $1,96 \pm 0,15$  (indução, n=23),  $2,0$  (-12 horas, n=2),  $2,25 \pm 0,14$  (-8 horas, n=16) e  $2,48 \pm 0,12$  (-4 horas, n=23). No tratamento 3, todas as éguas ovularam até o momento 44 horas. Neste caso, o momento 16 horas antes da ovulação (28 horas) não foi avaliado e, portanto, não está representado no gráfico. Os escores médios de ecogenicidade da camada de células da granulosa observados de acordo com os tratamentos estão representados na figura 21.

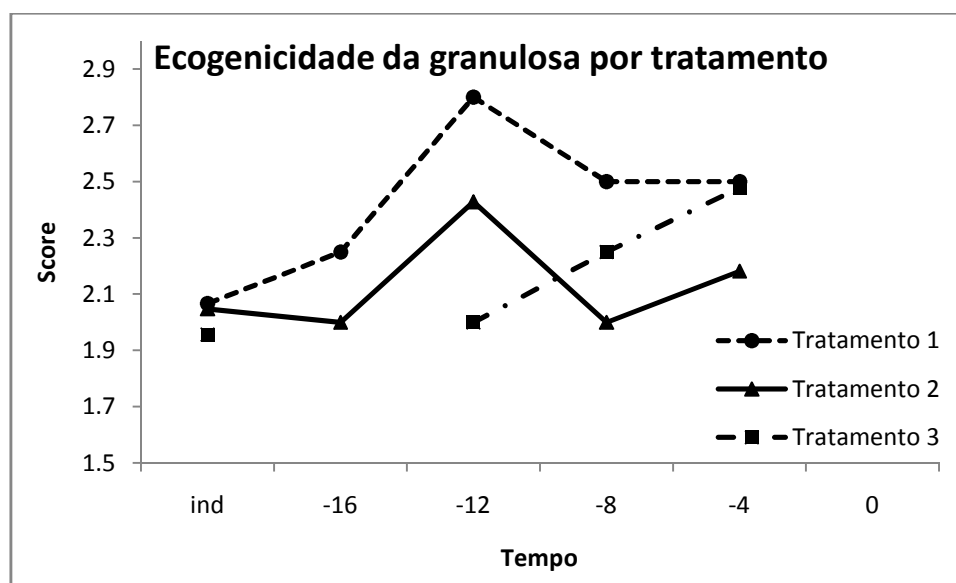


Figura 21. Escores médios de ecogenicidade da camada de células da granulosa nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0) nos tratamentos 1 (hCG), 2 (acetato de deslorelina) e 3 (deslorelina + hCG).

### 5.3 Características foliculares observadas através de ultrassonografia Doppler-colorido

- **Vascularização folicular**

A porcentagem da parede folicular apresentando vascularização variou significativamente durante as avaliações. Os valores encontrados na imagem ultrassonográfica Doppler foram  $25,76 \pm 1,47\%$  na indução ( $n=60$ ), aumentando para  $35,0 \pm 7,79\%$  no momento -16 horas ( $n=8$ ),  $40,71 \pm 4,62\%$  as -12 horas ( $n=14$ ),  $40,61 \pm 2,43\%$  no momento -8 horas ( $n=50$ ), terminando em  $50,57 \pm 2,03\%$  na última avaliação (momento -4 horas,  $n=60$ ). Diferença significativa foi encontrada entre a avaliação da indução e os momentos -12 horas ( $P=0,0005$ ), -8 horas ( $P<0,01$ ) e -4 horas ( $P<0,01$ ). Os valores encontrados para os momentos -4 e -8 também foram significativamente diferentes ( $P=0,0001$ ). As porcentagens da parede folicular apresentando vascularização na ultrassonografia Doppler-colorido estão representadas na figura 22.

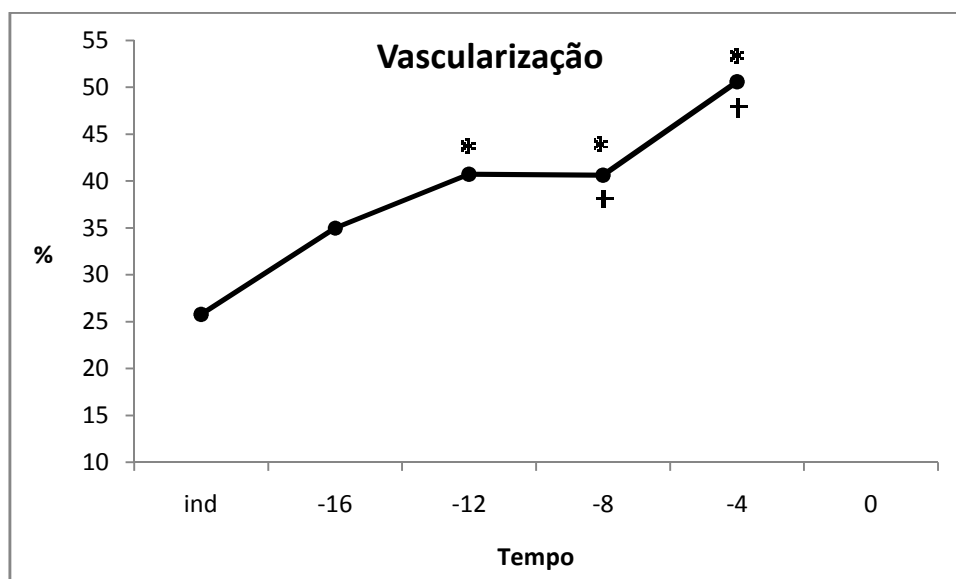


Figura 22. Médias da Porcentagem da parede folicular apresentando vascularização nas avaliações realizadas pela ultrassonografia Doppler em todos os ciclos avaliados, nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0). Aumentos significativos ( $P<0,05$ ) na vascularização folicular com relação ao momento da indução da ovulação são indicados por asterisco (\*). Diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre momentos é indicada por (+).

A vascularização folicular de éguas jovens e éguas idosas não diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ). Os valores encontrados na ultrassonografia Doppler de éguas jovens foram  $25,48 \pm 2,07\%$  na indução (ind,  $n=32$ ),  $50,0 \pm 20,0\%$  (-16 horas,  $n=2$ ),  $46,0 \pm 8,72\%$  (-12 horas,  $n=5$ ),  $42,73 \pm 3,49\%$  (-8 horas,  $n=23$ ) e  $51,13 \pm 3,06\%$  (-4 horas,  $n=32$ ). Em éguas idosas os valores de vascularização folicular observados foram  $26,07 \pm 2,14\%$  na indução (ind,  $n=28$ ),  $30,0 \pm 8,16\%$  (-16 horas,  $n=6$ ),  $37,78 \pm 5,47\%$  às -12 horas ( $n=9$ ),  $38,89 \pm 3,39\%$  (-8 horas,  $n=27$ ) e  $50,0 \pm 2,71\%$  (-4 horas,  $n=28$ ). Os valores de porcentagem da parede folicular vascularizada estão representados na figura 23.

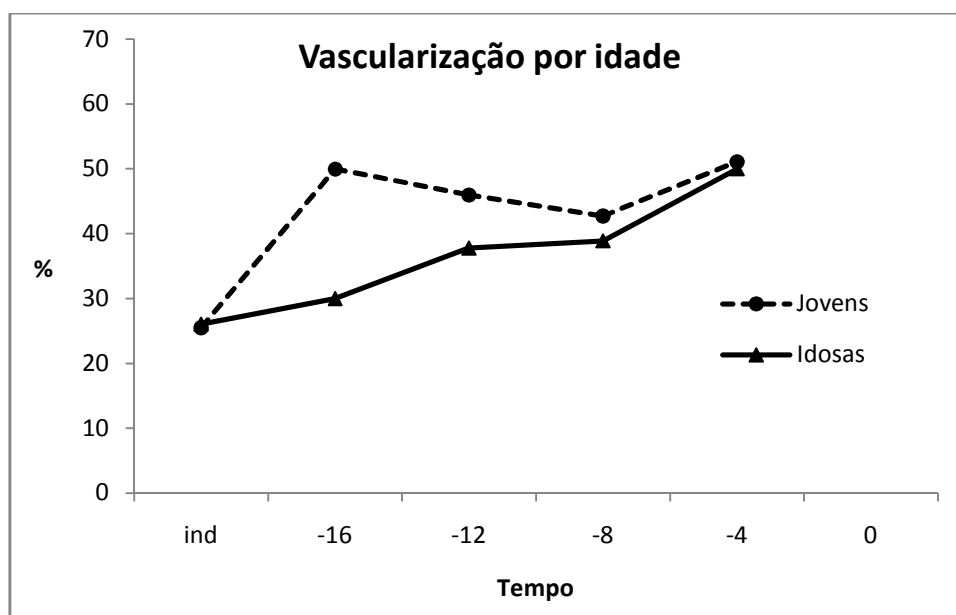


Figura 23. Médias das porcentagem da parede folicular apresentando sinais de vascularização quando avaliadas na ultrassonografia Doppler de éguas jovens (até 12 anos) e idosas ( $\geq 18$  anos) nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0).

A vascularização da parede folicular diferiu significativamente entre os períodos de avaliação de cada tratamento. Os valores de vascularização obtidos através da ultrassonografia Doppler no tratamento 1 (hCG) foram  $30,0 \pm 3,65\%$  na indução (ind, n=14),  $22,5 \pm 2,5\%$  (-16 horas, n=4),  $32,0 \pm 7,35\%$  (-12 horas, n=5),  $40,83 \pm 6,45\%$  (-8 horas, n=11) e  $52,81 \pm 4,61\%$  (-4 horas, n=14). Os momentos ind e -4 diferiram estatisticamente ( $P < 0,01$ ) e houve uma tendência de diferença entre os momentos ind e -8 ( $P = 0,052$ ). Os valores observados no tratamento 2 (acetato de deslorelina) foram  $23,33 \pm 2,22\%$  (indução, n=23),  $47,5 \pm 13,15\%$  (-16 horas, n=4),  $41,43 \pm 5,95\%$  (-12 horas, n=7),  $37,14 \pm 3,02\%$  (-8 horas, n=23) e  $45,91 \pm 3,33\%$  (-4 horas, n=23). Os valores de ind e -4 horas diferiram estatisticamente ( $P = 0,0001$ ) e houve uma tendência de diferença estatística entre ind e -8 ( $P = 0,06$ ). No tratamento 3 (hCG + acetato de deslorelina) as médias encontradas foram  $25,22 \pm 2,07\%$  na indução (ind, n=23),  $60,0 \pm 10,0\%$  (-12 horas, n=2),  $45,0 \pm 4,08\%$  (-8 horas, n=16) e  $53,48 \pm 2,85\%$  na última avaliação, quatro horas antes da ovulação (-4 horas, n=23). Diferiram estatisticamente os momentos ind e -4 ( $P < 0,01$ ) e ind e -8 ( $P = 0,0008$ ). No tratamento 3, todas as éguas ovularam até o momento 44 horas. Neste caso, o momento 16 horas antes da ovulação (28 horas) não foi avaliado e, portanto, não está representado no gráfico. Os valores da porcentagem da vascularização folicular estão representados na figura 24.

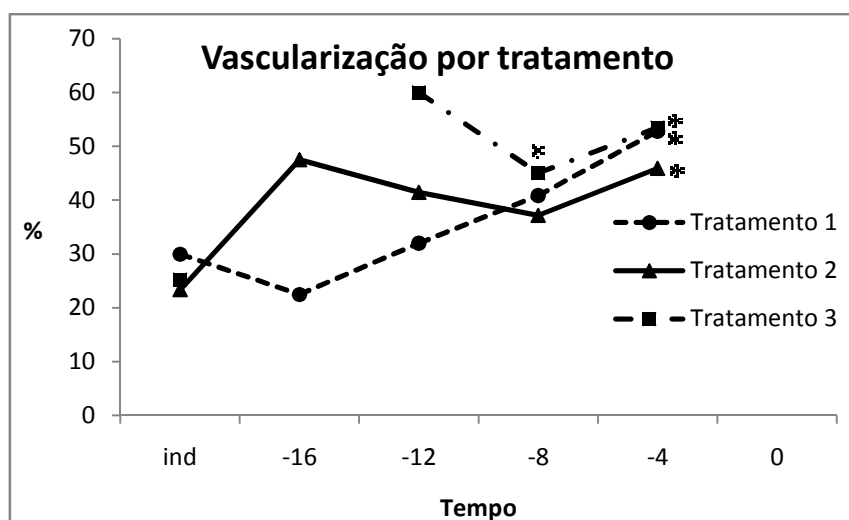


Figura 24. Vascularização folicular média na ultrassonografia Doppler nos tratamentos 1 (hCG), 2 (acetato de deslorelina) e 3 (hCG + acetato de deslorelina), nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0).



Aumentos significativos ( $P < 0,05$ ) na vascularização da parede folicular com relação ao momento da indução da ovulação são indicados por asterisco (\*).

- **Variação da Intensidade das cores da parede folicular**

Escores de intensidade das cores não diferiram significativamente entre as avaliações ( $P > 0,05$ ). Médias dos escores obtidos pela avaliação com ultrassonografia Doppler foram  $2,32 \pm 0,07$  na indução (ind,  $n=60$ ),  $1,88 \pm 0,13$  (-16 horas,  $n=8$ ),  $2,29 \pm 0,13$  (-12 horas,  $n=14$ ),  $2,33 \pm 0,07$  (-8 horas,  $n=50$ ) e  $2,13 \pm 0,07$  (-4 horas,  $n=60$ ). Os valores obtidos da intensidade das cores nos momentos avaliados estão representados na figura 25.

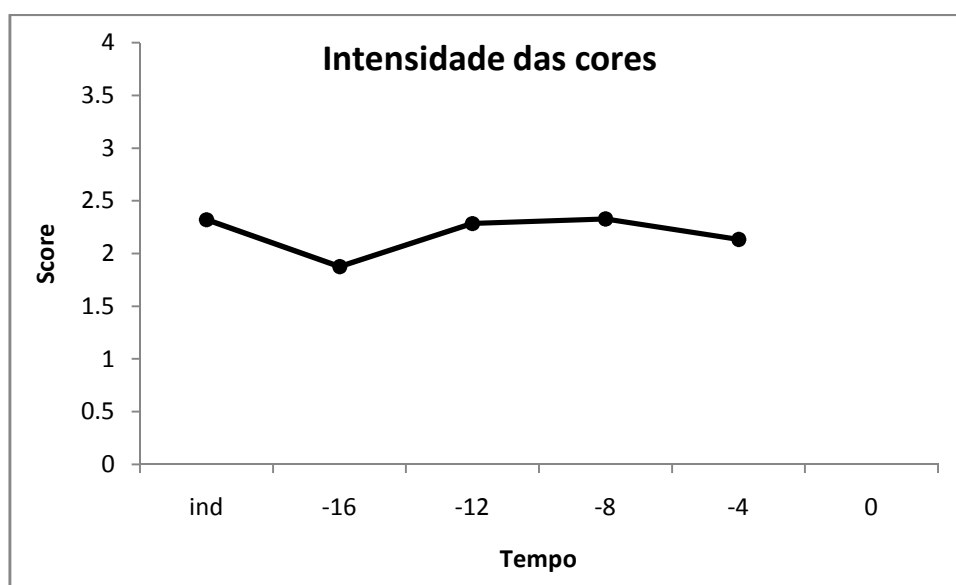


Figura 25. Intensidade média das cores observadas na ultrassonografia Doppler em todos os ciclos avaliados, nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0).

A intensidade das cores não diferiu estatisticamente entre éguas jovens (até 12 anos) e éguas idosas ( $\geq 18$  anos) ( $P > 0,05$ ). Os escores obtidos de éguas jovens foram  $2,39 \pm 0,11$  no momento da indução (ind,  $n=32$ ),  $2,0$  (-16 horas,  $n=2$ ),  $2,4 \pm 0,24$  (-12 horas,  $n=5$ ),  $2,23 \pm 0,09$  (-8 horas,  $n=23$ ) e  $2,07 \pm 0,11$  (-4 horas,  $n=32$ ). Os escores obtidos de éguas idosas foram  $2,25 \pm 0,08$  (ind,  $n=28$ ),  $1,83 \pm 0,17$  (-16 horas,  $n=6$ ),  $2,22 \pm 0,15$  (-12 horas,  $n=9$ ),  $2,41 \pm 0,1$  (-8 horas,  $n=27$ ) e  $2,2 \pm 0,09$  (-4 horas,  $n=28$ ). Os valores de intensidade das cores obtidos através da ultrassonografia Doppler estão representados na figura 26.

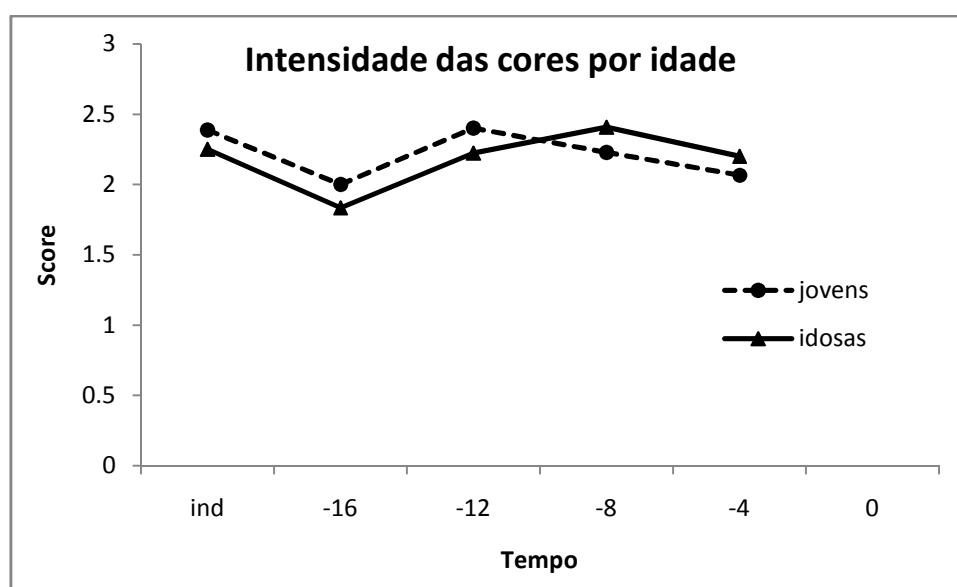


Figura 26. Escores médios da intensidade das cores observada na ultrassonografia Doppler de éguas jovens (até 12 anos) e idosas ( $\geq 18$  anos) nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação=0).

Os escores da intensidade das cores observados em cada tratamento, 1 (hCG), 2 (acetato de deslorelina) e 3 (acetato de deslorelina + hCG) não apresentaram diferença estatística. Os valores obtidos estão representados na figura 26. No tratamento 1 a intensidade das cores foi  $2,53 \pm 0,17$  (indução,  $n=14$ ),  $1,75 \pm 0,25$  (-16 horas,  $n=4$ ),  $2,6 \pm 0,24$  (-12 horas,  $n=5$ ),  $2,41 \pm 0,15$  (-8 horas,  $n=11$ ) e  $1,94 \pm 0,14$  (-4 horas,  $n=14$ ). No tratamento 2 os escores foram  $2,14 \pm 0,10$  (indução,  $n=23$ ),  $2,0$  (-16 horas,  $n=4$ ),  $2,14 \pm 0,14$  (-12 horas,  $n=7$ ),  $2,19 \pm 0,09$  (-8 horas,  $n=23$ ) e  $2,05 \pm 0,08$  (-4 horas,  $n=23$ ). A intensidade das cores no tratamento 3 foi  $2,35 \pm 0,1$  (indução,  $n=23$ ),  $2,0$  (-12 horas,  $n=2$ ),  $2,44 \pm 0,13$  (-8 horas,  $n=16$ ),  $2,35 \pm 0,12$  (-4 horas,  $n=23$ ). No tratamento 3, todas as éguas ovularam até o momento 44 horas. Neste caso, o momento 16 horas antes da ovulação (28 horas) não foi avaliado e, portanto, não está representado no gráfico. Os escores da intensidade das cores em cada tratamento estão representados na figura 27.

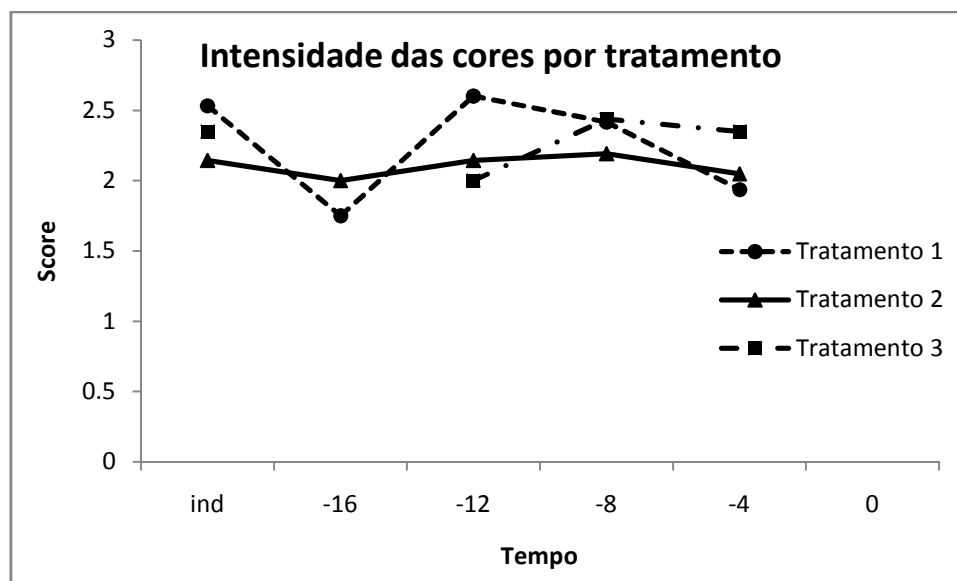


Figura 27. Escores médios de intensidade das cores observados através da ultrassonografia Doppler em todos os tratamentos (1- hCG, 2- acetato de deslorelina, 3- hCG + acetato de deslorelina) nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas (0=ovulação).

## 5.4 Achados da avaliação ultrassonográfica obtidos pelo modo-B

- **Variação no grau de edema uterino**

O edema uterino diminuiu ao decorrer das avaliações. Os valores médios observados em todos os ciclos avaliados foram  $2,75 \pm 0,08$  no momento da indução da ovulação (ind, n=60),  $1,33 \pm 0,34$  16 horas antes da ovulação (n=8),  $0,93 \pm 0,30$  12 horas antes de ocorrer a ovulação (n=14),  $1,04 \pm 0,14$  (-8 horas, n=47),  $0,74 \pm 0,12$  4 horas antes de ovular (n=47) e  $0,59 \pm 0,14$  no momento da ovulação (n=32). Houve diferença entre o momento da indução da ovulação e os momentos -12 horas ( $P=0.004$ ), -8 horas ( $P<0,001$ ), -4 horas ( $P<0,001$ ) e 0 hora ( $P<0,001$ ). Os valores de edema uterino obtidos na ultrassonografia modo-B estão representados na figura 28.

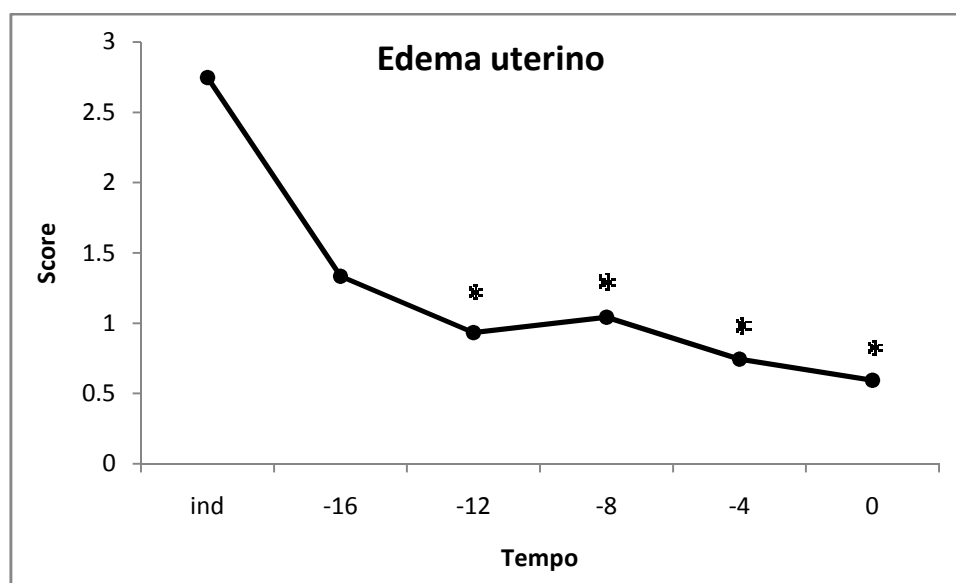


Figura 28. Edema uterino médio observado na ultrassonografia modo-B em todos os ciclos avaliados nos momentos ind (indução), -16, -12, -8 e -4 horas antes da ovulação (0). Aumentos significativos ( $P<0,05$ ) na vascularização folicular com relação ao momento da indução da ovulação são indicados por asterisco (\*).

O edema uterino observado na ultrassonografia modo-B de éguas jovens apresentou os valores  $2,71\pm 0,13$  (indução,  $n=32$ ),  $0,67\pm 0,67$  (-16 horas,  $n=2$ ),  $0,5\pm 0,5$  (-12 horas,  $n=5$ ),  $0,85\pm 0,21$  (-8 horas,  $n=20$ ),  $0,59\pm 0,17$  (-4 horas,  $n=23$ ) e  $0,54\pm 0,18$  no momento da ovulação (0,  $n=14$ ). Éguas idosas apresentaram declínio mais lento do edema uterino, sendo os valores  $2,78\pm 0,1$  no momento da indução da ovulação ( $n=28$ ),  $1,67\pm 0,36$  (-16 horas,  $n=6$ ),  $1,22\pm 0,37$  (-12 horas,  $n=9$ ),  $1,85\pm 0,18$  (-8 horas,  $n=27$ ),  $0,9\pm 0,18$  (-4 horas,  $n=24$ ) e  $0,64\pm 0,2$  no momento da ovulação (0 hora,  $n=18$ ). Não houve diferença nos valores de edema uterino entre éguas jovens e idosas ( $P=0,3221$ ). Escores de edema uterino de éguas jovens e idosas estão representados na figura 29.

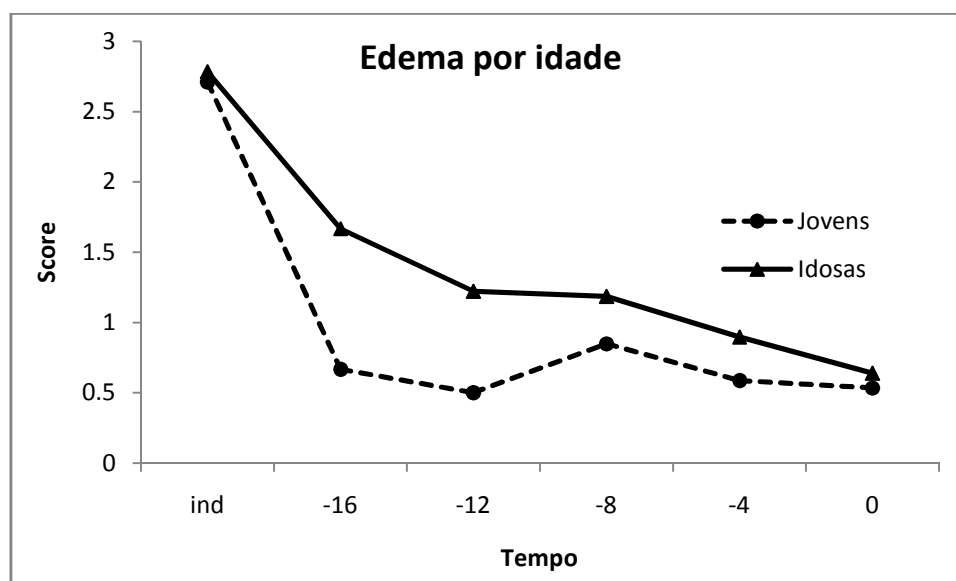


Figura 29. Escores médios de edema uterino de éguas jovens e idosas obtidos pela ultrassonografia modo-B nos momentos indução da ovulação (ind), -16, -12, -8, -4 horas e ovulação (0 hora).

O edema uterino de acordo com o tratamento variou numericamente entre os momentos a partir da indução da ovulação, porém sem diferença estatística entre os tratamentos ( $P=0,5304$ ), tratamento 1 (hCG), tratamento 2 (acetato de deslorelina) e tratamento 3 (hCG + acetato de deslorelina). Os escores de edema uterino observados na ultrassonografia modo-B no tratamento 1 foram  $2,88\pm 0,17$  (indução=ind,  $n=14$ ),  $1,6\pm 0,43$  (-16 horas,  $n=4$ ),  $1,5\pm 0,55$  (-12 horas,  $n=5$ ),  $1,27\pm 0,30$  (-8 horas,  $n=11$ ),  $0,73\pm 0,19$  (-4 horas,  $n=13$ ) e  $0,75\pm 0,27$  (ovulação= 0 hora,  $n=8$ ). No tratamento 2 foram obtidos os valores  $2,57\pm 0,16$  (ind= indução da ovulação,  $n=23$ ),  $1,0\pm 0,58$  (-16 horas,  $n=4$ ),  $0,81\pm 0,42$  (-12 horas,  $n=7$ ),  $1,13\pm 0,22$  (-8 horas,  $n=20$ ),  $0,93\pm 0,26$  (-4 horas,  $n=15$ ) e  $0,82\pm 0,29$  (ovulação= 0 hora,  $n=11$ ). Os valores no tratamento 3 foram  $2,83\pm 0,09$  (indução da ovulação,  $n=23$ ), 0 (-12 horas,  $n=2$ ),  $0,78\pm 0,21$  (-8 horas,  $n=16$ ),  $0,61\pm 0,19$  (-4 horas,  $n=19$ ) e  $0,31\pm 0,14$  no momento da ovulação ( $n=13$ ). No tratamento 3, todas as éguas ovularam até o momento 44 horas. Neste caso, o momento 16 horas antes da ovulação (28 horas) não foi avaliado e, portanto, não está representado no gráfico. Os escores de edema uterino obtidos nos momentos das avaliações estão representados na figura 30.

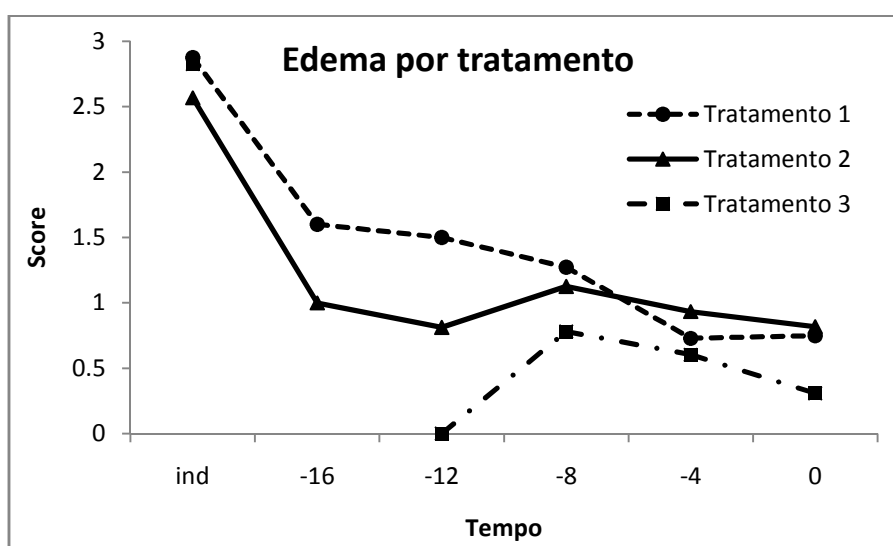


Figura 30. Classificação do edema uterino de éguas quando submetidas ao tratamento 1 (hCG), tratamento 2 (acetato de deslorelina) e tratamento 3 (hCG + acetato de deslorelina), nos momentos ind (indução da ovulação), -16, -12, -8, -4 horas e ovulação (0 hora).

- **Variação da flutuação do folículo**

Os escores de flutuação folicular aumentaram numericamente ao decorrer das avaliações. Os valores encontrados na palpação retal foram  $1,71 \pm 0,1$  no momento da indução da ovulação ( $n=26$ ),  $2,06 \pm 0,06$  (-16 horas,  $n=9$ ),  $2,25 \pm 0,2$  (-12 horas,  $n=10$ ),  $2,2 \pm 0,13$  (-8 horas,  $n=28$ ) e  $2,37 \pm 0,12$  (-4 horas,  $n=31$ ). Houve diferença estatística entre indução da ovulação e os momentos -8 horas ( $P=0,01$ ) e -4 horas ( $P<0,001$ ). Os escores de flutuação folicular obtidos à palpação estão representados na figura 31.

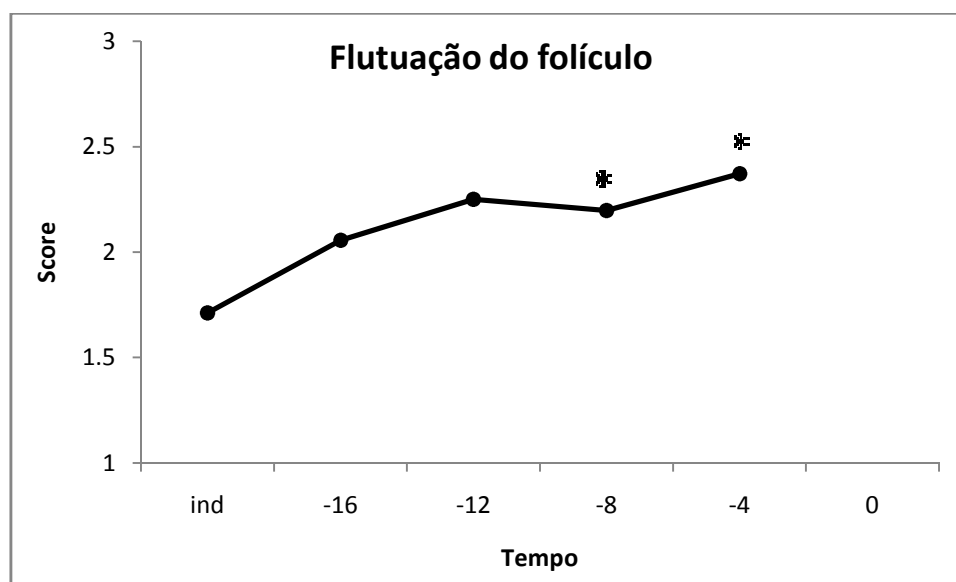


Figura 31. Escores médios da flutuação folicular em todos os ciclos avaliados obtidos pela palpação retal nos momentos ind (indução da ovulação), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação= 0 hora). Aumentos significativos ( $P<0,05$ ) na vascularização folicular com relação ao momento da indução da ovulação são indicados por asterisco (\*).

Não houve diferença estatística entre éguas jovens e idosas com relação a flutuação folicular ( $P=0,5676$ ). Os valores de flutuação folicular obtidos nas avaliações das éguas jovens foram  $1,71\pm 0,12$  na indução da ovulação (ind,  $n=19$ ),  $2,0$  (-16 horas,  $n=3$ ),  $2,3\pm 0,37$  (-12 horas,  $n=5$ ),  $2,17\pm 0,2$  (-8 horas,  $n=15$ ) e  $2,41\pm 0,17$  (-4 horas,  $n=17$ ). Éguas idosas apresentaram escore  $1,71\pm 0,18$  na indução da ovulação (ind,  $n=7$ ),  $2,08\pm 0,08$  (-16 horas,  $n=6$ ),  $2,2\pm 0,2$  (-12 horas,  $n=5$ ),  $2,23\pm 0,18$  (-8 horas,  $n=13$ ) e  $2,32\pm 0,15$  (-4 horas,  $n=14$ ). Os escores médios de flutuação folicular obtidos através da palpação retal estão representados na figura 32.

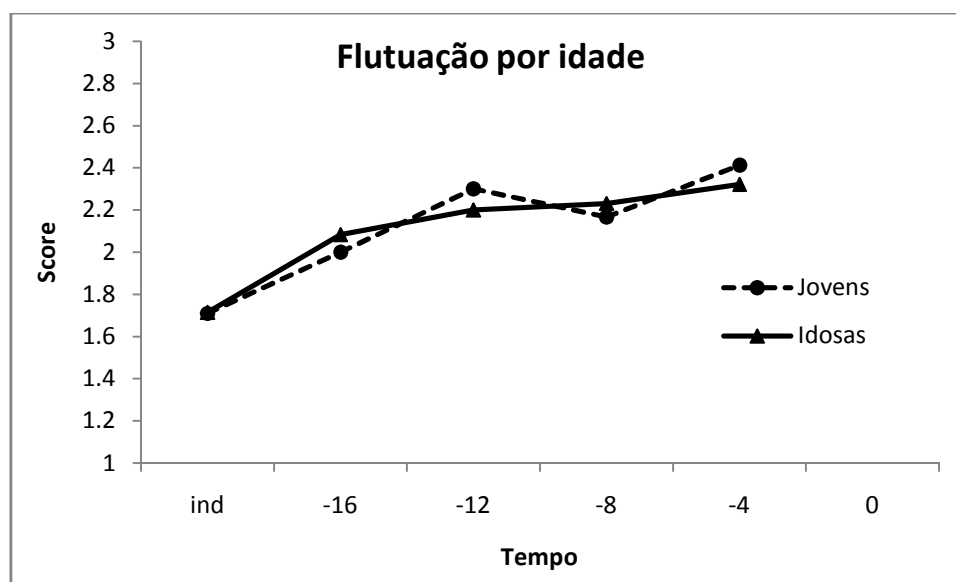


Figura 32. Escores médios de flutuação folicular de éguas jovens (até 12 anos) e idosas ( $\geq 18$  anos) obtidos pela palpação retal, nos momentos indução da ovulação (ind), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação= 0 hora)



A flutuação folicular encontrada através da palpação retal no tratamento 1(hCG) foi  $1,75 \pm 0,19$  no momento da indução da ovulação (ind, n=8),  $2,1 \pm 0,1$  (-16 horas, n=5),  $2,0$  (-12 horas, n=2),  $2,33 \pm 0,25$  (-8 horas, n=6) e  $2,25 \pm 0,2$  (-4 horas, n=10). No tratamento 2 (acetato de deslorelina) os valores encontrados foram  $1,7 \pm 0,17$  na indução (ind, n=10),  $2,0$  (-16 horas, n=4),  $2,36 \pm 0,28$  (-12 horas, n=7),  $2,27 \pm 0,22$  (-8 horas, n=13) e  $2,22 \pm 0,18$  (-4 horas, n=11). Os valores obtidos no tratamento 3 (hCG + acetato de deslorelina) foram  $1,68 \pm 0,16$  na indução (ind, n=8),  $2,0$  (-12 horas, n=1),  $2,0 \pm 0,22$  (-8 horas, n=9) e  $2,65 \pm 0,21$  (-4 horas, n=10). No tratamento 3, todas as éguas ovularam até o momento 44 horas. Neste caso, o momento 16 horas antes da ovulação (28 horas) não foi avaliado e, portanto, não está representado no gráfico. Não houve diferença da flutuação folicular entre os tratamentos ( $P=0,9572$ ). A figura 33 representa os escores médios de flutuação folicular encontrada nos tratamentos.

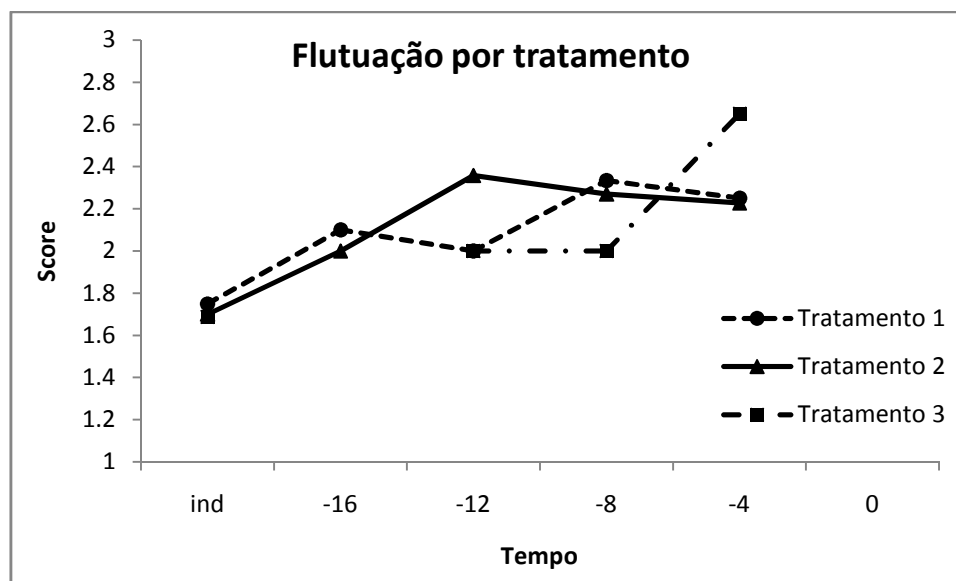


Figura 33. Escores médios de flutuação folicular obtidos através da palpação retal para os tratamentos 1 (hCG), 2 (acetato de deslorelina) e 3 (hCG + acetato de deslorelina) nos momentos ind (indução da ovulação), -16, -12, -8 e -4 horas (ovulação= 0).

### 5.5 Éguas que não ovularam

Nove éguas não ovularam até 48 horas após a indução da ovulação. Oito das nove éguas tinham idade  $\geq 18$  anos (idosas) e apenas uma jovem (11 anos – grupo até 12 anos). As não ovulações foram sempre em ciclos nos quais a indução da ovulação foi realizada com hCG. Todas as éguas utilizadas neste trabalho já pertenciam a programas de reprodução assistida e haviam previamente recebido tratamentos para indução da ovulação ao longo de suas vidas.

A dinâmica do crescimento folicular observado em éguas que não ovularam apresentou um aumento numérico expressivo entre os momentos 0 hora (indução da ovulação) e 32 horas,  $32,56 \pm 0,79$ mm e  $36,11 \pm 1,42$  respectivamente. No momento 36 horas após indução da ovulação os folículos apresentaram  $35,65 \pm 1,71$ mm,  $35,67 \pm 1,69$ mm as 40 horas,  $37,44 \pm 1,40$ mm nas 44 horas e  $36,98 \pm 1,88$ mm 48 horas após o tratamento para indução da ovulação. Os diâmetros foliculares observados nas éguas que não ovularam no intervalo de tempo esperado estão representados na figura 34.

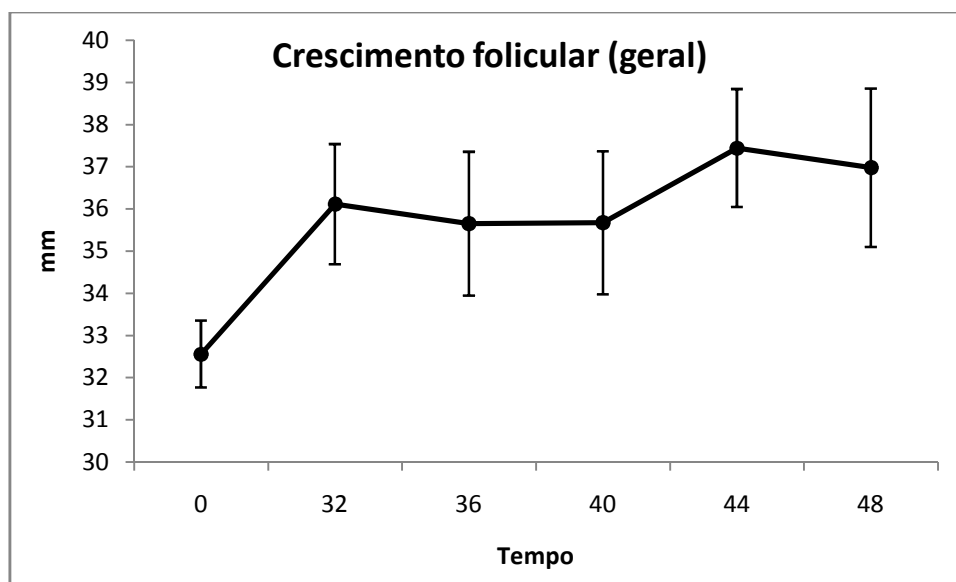


Figura 34. Crescimento folicular médio das éguas que não ovularam até 48 horas após tratamento para indução da ovulação. Diâmetro apresentado nos momentos 0 hora (indução da ovulação), 32h, 36h, 40h, 44h e 48h.

Os valores da banda anecóica observados na ultrassonografia modo-B de éguas que não ovularam foram  $40,0 \pm 4,47\%$  na indução da ovulação (0 hora),  $35,0 \pm 6,46\%$  32 horas após a indução,  $45,0 \pm 15,55\%$  as 36 horas,  $44,0 \pm 4,0\%$  40 horas após indução,  $38,0 \pm 3,74\%$  (44 horas) e  $45,0 \pm 5,0\%$  na ultima avaliação (48 horas após a indução da ovulação).

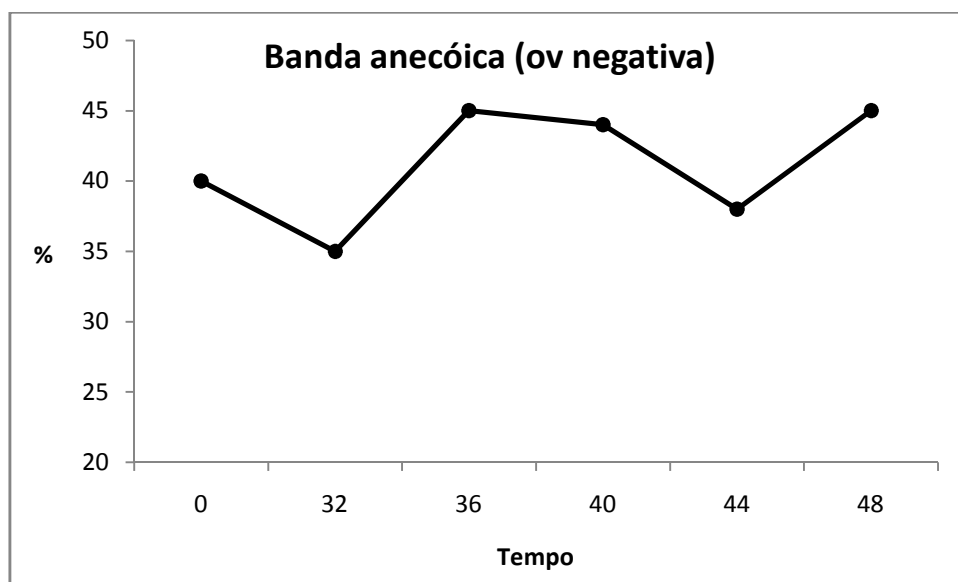


Figura 35. Porcentagem média de banda anecóica ao redor da circunferência folicular de éguas que não ovularam até 48 horas após o tratamento para indução da ovulação. Banda anecóica apresentada nos momentos 0 hora (indução), 32h, 36h, 40h, 44h e 48h após a indução da ovulação.

Escores de ecogenicidade da granulosa foram obtidos através da ultrassonografia modo-B. Os valores obtidos foram  $2,24 \pm 0,14$  (0 hora= indução da ovulação),  $2,0 \pm 0,22$  (32 horas),  $2,0 \pm 0,31$  (36 horas), 2,0 (40 horas),  $2,29 \pm 0,18$  (44 horas) e 2,0 na última avaliação (48 horas após indução). Os valores de escores de ecogenicidade da granulosa observados estão representados na figura 36.

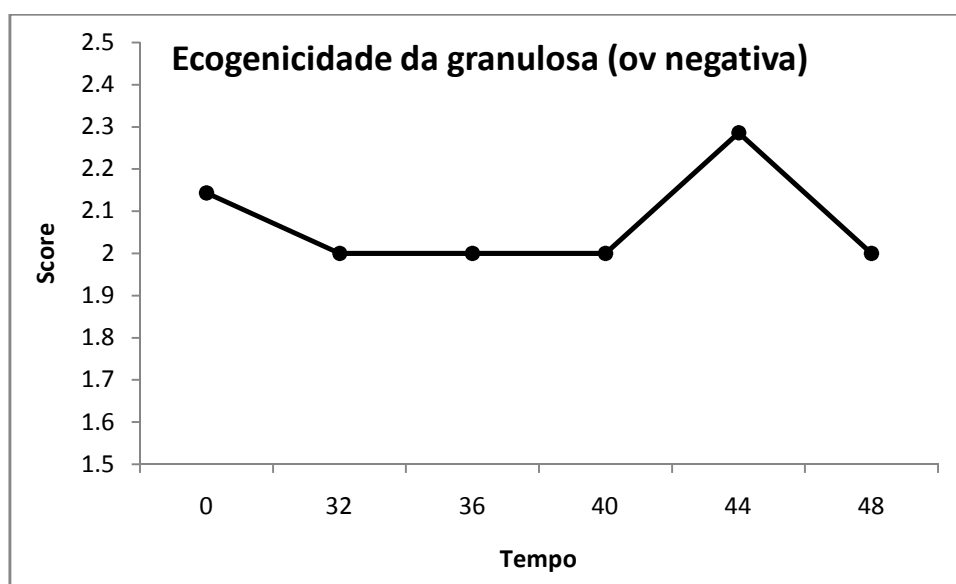


Figura 36. Escores médios de ecogenicidade da granulosa observada na ultrassonografia modo-B de éguas que não ovularam até 48 horas após o tratamento para indução da ovulação. Valores apresentados nos momentos 0 hora (indução da ovulação), 32h, 36h, 40h, 44h e 48 horas após indução da ovulação.

A espessura da camada da granulosa de éguas que não ovularam até 48 horas após o tratamento para indução da ovulação variou pouco numericamente entre os momentos de avaliação. Os valores obtidos foram  $1,19\pm 0,20$ mm na indução da ovulação (hora 0),  $1,37\pm 0,09$ mm (32 horas),  $1,51\pm 0,3$  (36 horas),  $1,46\pm 0,13$  (40 horas),  $1,5\pm 0,15$  (44 horas) e  $1,48\pm 0,2$  (48 horas). A espessura da camada da granulosa de éguas que não ovularam está representada na figura 37.

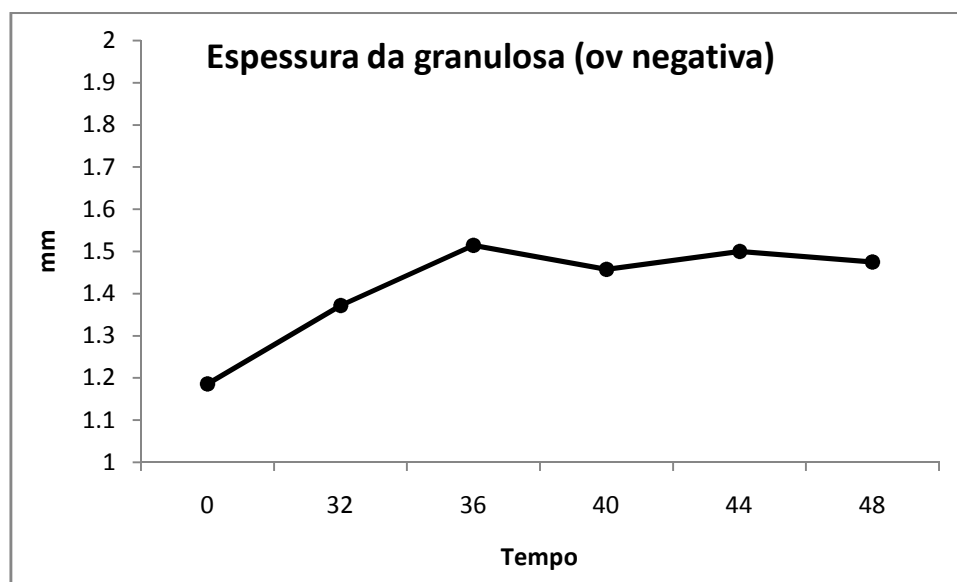


Figura 37. Espessura média da camada da granulosa observada na ultrassonografia modo-B de éguas que não ovularam até 48 horas após indução da ovulação. Valores encontrados nos momentos 0 hora (indução), 32h, 36h, 40h, 44h e 48 horas após tratamento.

A vascularização folicular avaliada pela ultrassonografia Doppler variou de forma inconsistente entre os momentos avaliados. A porcentagem de parede folicular de éguas que não ovularam apresentando vascularização foi de  $31,43 \pm 4,59\%$  no momento da indução da ovulação (hora 0),  $22,85 \pm 5,65\%$  32 horas após tratamento,  $28,57 \pm 4,59\%$  (36 horas),  $30,0 \pm 5,35\%$  (40 horas),  $25,71 \pm 5,71\%$  (44 horas) e  $35,0 \pm 8,66\%$  na última avaliação, 48 horas após indução da ovulação. As porcentagens de parede folicular apresentando sinais coloridos estão representadas na figura 38.

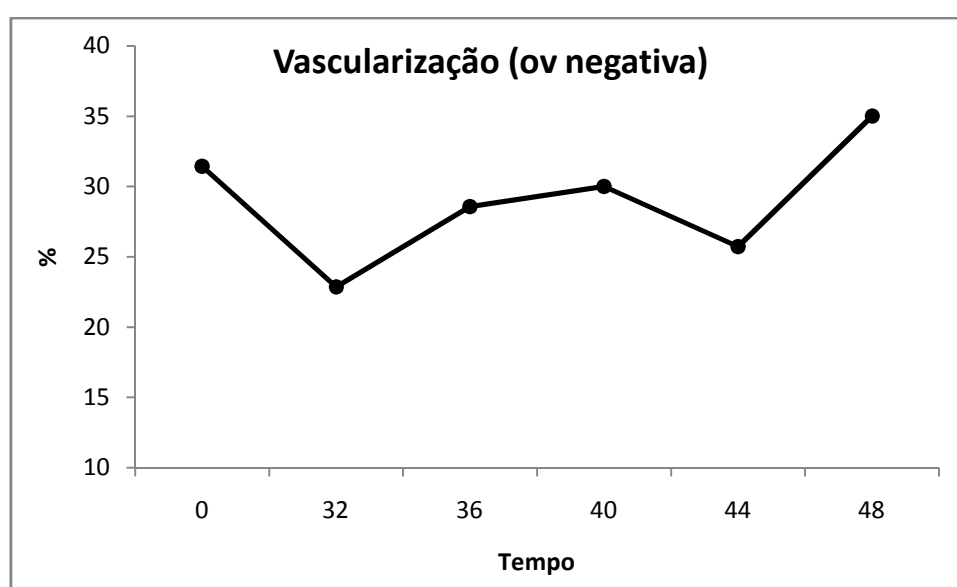


Figura 38. Porcentagens médias de parede folicular apresentando vascularização na ultrassonografia Doppler de éguas que não ovularam até 48 horas após o tratamento para indução da ovulação. Avaliações realizadas nos momentos 0 hora (indução), 32h, 36h, 40h, 44h e 48 horas após indução da ovulação.

Os escores de intensidade das cores foram avaliados pela ultrassonografia Doppler e os valores obtidos para éguas que não ovularam até 48 horas após a indução da ovulação foram  $2,57 \pm 0,2$  (hora 0= indução da ovulação),  $2,14 \pm 0,26$  (32 horas),  $2,43 \pm 0,2$  (36 horas),  $2,29 \pm 0,18$  (40 horas),  $2,43 \pm 0,2$  (44 horas) e  $2,75 \pm 0,25$  (48 horas – última avaliação). A intensidade das cores nos momentos avaliados está representada na figura 39.

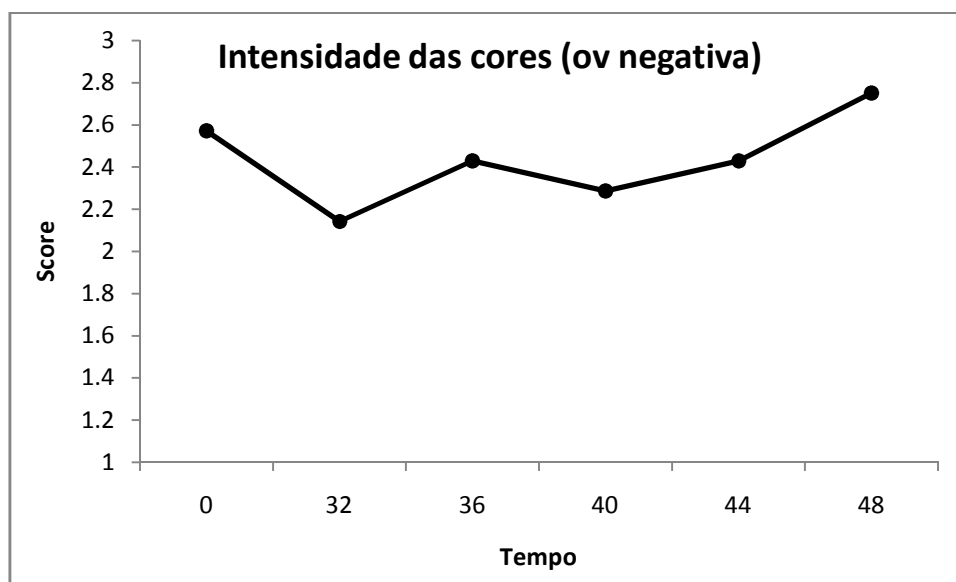


Figura 39. Intensidade das cores média avaliada na ultrassonografia Doppler de éguas que não ovularam até 48 horas após tratamento para indução da ovulação. Momentos 0 hora (indução), 32h, 36h, 40h, 44h e 48h após indução.

Edema uterino de éguas que não ovularam até 48 horas após indução da ovulação foi  $2,43 \pm 0,37$  (hora 0= indução),  $1,86 \pm 0,51$  (32 horas),  $1,83 \pm 0,4$  (36 horas),  $2,17 \pm 0,42$  (40 horas),  $1,64 \pm 0,45$  (44 horas) e  $1,33 \pm 0,54$  (48 horas – última avaliação). Os valores de edema uterino obtidos estão representados na figura 40.

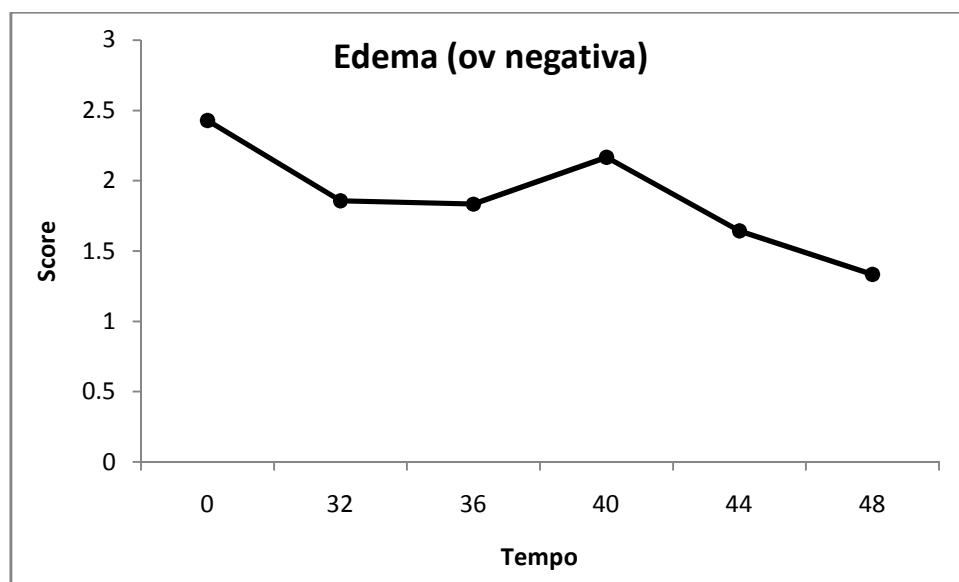


Figura 40. Edema uterino médio de éguas que não ovularam até 48 horas após o tratamento para indução da ovulação. Avaliações realizadas nas horas 0 (indução), 32h, 36h, 40h, 44h e 48h.



A flutuação folicular de éguas que não ovularam aumentou numericamente entre os períodos avaliados. Os valores obtidos através da palpação retal foram 1,0 (indução),  $1,88 \pm 0,43$  (32 horas),  $1,88 \pm 0,31$  (36 horas),  $1,88 \pm 0,13$  (40 horas),  $2,0 \pm 0,2$  (44 horas) e  $2,33 \pm 0,17$  (48 horas). Os valores encontrados estão representados na figura 41.

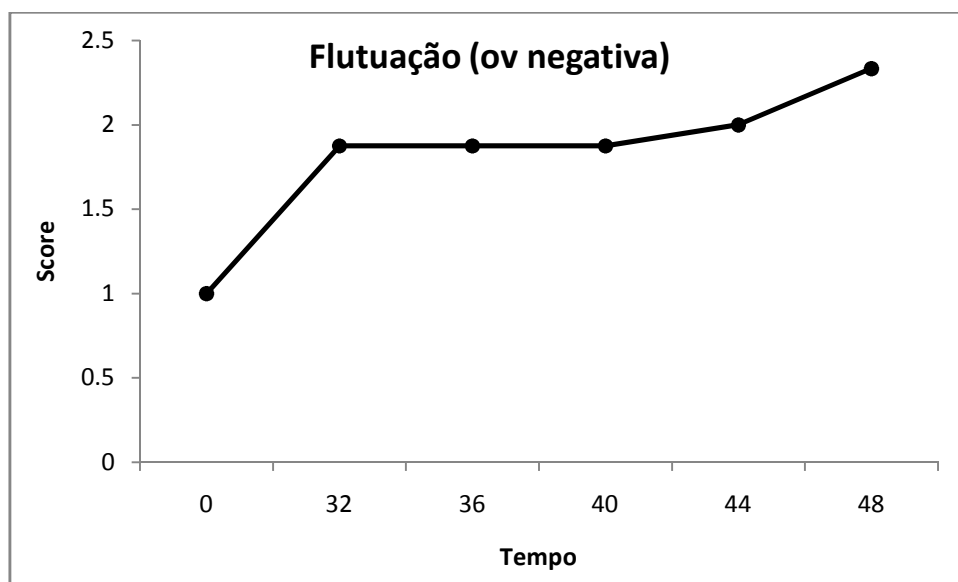


Figura 41. Flutuação folicular média observada na palpação retal de éguas que não ovularam até 48 horas após tratamento para indução da ovulação. Avaliações realizadas nos momentos indução (hora 0), 32h, 36h, 40h, 44h e 48 horas após indução.

*Discussão*

---

## 6. DISCUSSÃO

O intervalo esperado entre indução da ovulação e ovulação é de 36 horas para hCG (SAMPER, 2008; BARBACINI et al., 2000; MCCUE et al., 2004; SAMPER et al., 2002) e 40-46 horas para acetato de deslorelina (SAMPER, 2008; MELO et al., 2005). No presente estudo, éguas jovens apresentaram intervalos de resposta à indução da ovulação similares aos descritos anteriormente. Em ambos os ciclos, hCG e acetato de deslorelina, os intervalos foram concordantes com a literatura sendo mais longos para acetato de deslorelina ( $42,8 \pm 1,0$  horas) que para hCG ( $38,7 \pm 1,1$  horas) ou associação ( $38,0 \pm 1,0$  horas). Éguas idosas também apresentaram mesmo intervalo entre indução e ovulação nos ciclos induzidos com acetato de deslorelina ( $41,3 \pm 0,9$  horas) concordando com a literatura (SAMPER, 2008; MELO et al., 2005), porém quando o hCG foi utilizado essas éguas demoraram mais a ovular ( $44,0 \pm 1,6$  horas). Não existem relatos a respeito deste intervalo mais longo entre indução com hCG e ovulação em éguas idosas, fato que poderia estar associado com presença de anticorpos contra hCG neste animais. Quando a associação dos dois agentes foi utilizada, éguas jovens ovularam em intervalo similar ao observado em induções com hCG. Quando a associação (hCG + acetato de deslorelina) foi utilizada em éguas idosas o intervalo foi numericamente mais próximo ao observado em ciclos tratados com acetato de deslorelina. Não foram encontradas na literatura comparações do tempo entre indução e ovulação de éguas jovens e idosas, com diferentes tratamentos para indução da ovulação.

Após a indução da ovulação os folículos apresentaram queda na taxa de crescimento diário esperado durante o estro de 2,5 a 3,0mm (MCKINNON e VOSS, 1993). O maior diâmetro folicular observado foi 1,44mm maior do que no momento da indução da ovulação, dado observado 12 horas antes da ovulação (momento no qual atingiu diâmetro máximo). Após este momento os folículos apresentaram uma diminuição no diâmetro de 1,16mm em média, porém sem diferença estatística. Característica similar foi observada por Gastal et al. (2006a) que descreveram ocorrer uma estagnação do crescimento folicular a partir de 36h após a indução da ovulação até o momento em que esta ocorre. O mesmo foi

encontrado por este autor ao acompanhar éguas controle (sem indução da ovulação); neste caso, 36h antes da ovulação os folículos apresentaram ausência de crescimento médio.

Silva et al. (2006) descreveram que folículos que cresceram no intervalo entre indução da ovulação com hCG e 30 horas após, resultaram em gestação (crescimento total de 1,5mm) quando comparados a folículos que não cresceram após a indução da ovulação e também não resultaram em gestação. No presente estudo não foi avaliada a taxa de gestação das éguas.

A ocorrência da diminuição no diâmetro folicular imediatamente antes da ovulação pode ter sido resultante da diminuição da pressão folicular interna e conseqüente irregularidade do formato folicular. Tal fato foi observado em todos os ciclos, hCG, GnRH e associação. Sendo assim parece haver uma associação entre indução da ovulação e inibição do crescimento folicular, fato que fica ainda mais evidente quando a curva de crescimento folicular de éguas que ovularam é comparada com a curva de crescimento de éguas que não responderam ao tratamento e não produziram ovulação. Folículos de éguas que não ovularam após o tratamento continuaram crescendo a uma taxa média de 3,5mm ao dia.

Não houve diferença no diâmetro folicular de éguas jovens e idosas no momento da indução da ovulação ( $33,61 \pm 0,50$  e  $33,35 \pm 0,59$  respectivamente). Da mesma forma, também não foi observada diferença no tamanho do folículo no momento mais próximo da ovulação ( $34,27 \pm 0,58$  e  $33,25 \pm 0,74$  para éguas jovens e idosas respectivamente). Estudos anteriores (JACOB 2007; CARNEVALE et al., 1993a; GINTHER et al., 2009) descreveram não haver diferenças no diâmetro do maior folículo de éguas jovens e idosas no dia anterior à ovulação. Contudo, em estudo recente, Davis Morel et al. (2010) observaram que a média do diâmetro do folículo pré-ovulatório variou de  $33,3 \pm 4,66$ mm a  $38,95 \pm 5,61$ mm para éguas idosas ( $\geq 19$  anos) e jovens (2 a 4 anos) respectivamente, sendo a idade da égua fator determinante com efeito negativo na média do diâmetro folicular. Os trabalhos anteriormente citados utilizaram éguas nas quais não foi realizado tratamento para indução da ovulação, tendo todos os autores utilizado éguas que ovularam

espontaneamente, sendo assim, não é possível estabelecer uma comparação entre o presente trabalho com os encontrados na literatura.

Segundo McKinnon et al. (1988), nas 24 horas que antecedem a ovulação ocorre a diminuição da tensão do folículo em aproximadamente 70% das éguas. Ultrasonograficamente, este fato está relacionado a uma mudança no formato do folículo de esférico para alongado ou irregular, que pode ser conseqüência do rompimento do estroma ovariano quando o folículo se dirige em direção a fossa preparando-se para a ovulação e a liberação do oócito (MCKINNON et al., 1988). No presente estudo foi observado que os folículos se comportaram da mesma forma, os quais foram perdendo seu formato esférico e tornando-se irregulares. No momento 16 horas antes da ovulação os folículos apresentavam-se 100% regulares mudando seu formato para 73,77% irregulares no momento mais próximo da ovulação. Na palpação o que se observa é o aumento da flutuação do folículo, ou seja, torna-se menos resistente. Essa característica é clássica na descrição de iminência da ovulação e é bastante confiável para determinar uma ovulação próxima de acontecer (CARNEVALE et al., 1988), porém por não ocorrer em 100% dos casos, não pode ser utilizada isoladamente para prever a ovulação.

A formação de uma banda anecóica na área entre as camadas da teca aumentou diariamente e progressivamente no período de três a um dia antes da ovulação (GASTAL et al., 1998). Segundo Gastal et al. (1998 e 2006a) a banda anecóica atingiu 100% da circunferência folicular no período pré-ovulatório. No presente estudo a banda anecóica aumentou na média geral de 34,76% na indução para 51,28% no momento 4h anterior a ovulação. Apesar de ter sido observado um aumento na porcentagem da circunferência do folículo apresentando banda anecóica, esse aumento não foi tão expressivo quanto descrito por Gastal et al. (2006a) em éguas submetidas a tratamento para indução da ovulação com hCG e em éguas controle. Apesar das características descritas anteriormente sugere-se que o aumento intenso na banda anecóica formada ao redor do folículo não seja tão aparente quando é utilizado tratamento para indução da ovulação visto ainda que não houve diferença entre os três tratamento

utilizados. Éguas jovens e idosas também não apresentaram diferenças em relação a formação da banda anecóica.

Ainda segundo Gastal et al. (2006a), nas quatro horas que antecederam a ovulação ocorreu uma diminuição na porcentagem do folículo envolvida pela banda anecóica. Esta característica não foi observada no presente estudo, provavelmente pelo fato de terem sido utilizados intervalos maiores entre avaliações que os intervalos do referido trabalho. Porém, acreditamos que apesar de o intervalo entre avaliações ter sido mais longo, a última avaliação foi realizada tanto em éguas que ovularam após longo período (4h) como para éguas que ovularam minutos após o exame. Sendo assim, provavelmente esta diminuição na porcentagem de banda anecóica seria identificada. Além disso, quanto mais próximo da ovulação, mais o folículo encontra-se irregular e sendo assim, mais difícil se torna a avaliação do folículo em sua totalidade.

Ao induzir éguas com hCG, Kerban et al. (1999) observaram que o tratamento com a gonadotropina causou um afrouxamento evidente da camada de células da granulosa resultando em aumento significativo de sua espessura de  $77,8 \pm 4,8 \mu\text{m}$  para  $158,8 \pm 4,8 \mu\text{m}$  entre 0 e 39h após hCG ( $P < 0,01$ ) como consequência do acúmulo de material mucóide entre as células (glicosaminoglicanos ácido hialurônico, heparan sulfato ou dermatan sulfato). Gastal et al. (2006a) avaliaram a espessura da camada de células da granulosa por escore (1-3 sendo 1 mínimo e 3 máximo) de folículos de éguas induzidas a ovular com hCG. O aumento foi expressivo e variou de aproximadamente 1,8 a 3,0 nos momentos indução da ovulação e 1h antes da ovulação respectivamente. No presente estudo, a espessura da camada de células da granulosa foi medida na imagem do ultrassom e variou de 1,4mm no momento da indução para 2,0mm no momento anterior a ovulação, com diferença estatística entre os momentos, concordando com os achados descritos anteriormente. A espessura da camada de células da granulosa na imagem ultrassonográfica não foi um fator determinante para diferenciação entre as faixas etárias e não variou entre os três tipos de tratamentos utilizados, ou seja, éguas jovens e idosas apresentaram a mesma variação em qualquer tratamento utilizado.

A ecogenicidade da camada de células da granulosa aumentou durante o período de avaliação, porém sem significância estatística. O aumento da ecogenicidade já foi descrito na literatura (KERBAN et al., 1999; GASTAL et al., 1998) mas nunca foi sugerido como um fator determinante para prever a ovulação. Escores encontrados variaram de 2,0 a 2,5 nos momentos da indução e anterior a ovulação respectivamente. Gastal et al. (2006a) encontraram aumento de escore 2,0 na indução para 3,0 no momento anterior a ovulação. O aumento na ecogenicidade da camada de células da granulosa antes da ovulação é compatível com os resultados de estudos histológicos em éguas e provavelmente resulta da separação entre as células pelas mucosubstâncias produzidas após administração de gonadotropinas, o que provavelmente aumenta a qualidade refletiva das interfaces teciduais (KERBAN et al., 1999). A ecogenicidade da camada de células da granulosa não foi diferente entre os três tratamentos realizados, sugerindo que qualquer um dos métodos de indução da ovulação provoca afrouxamento das células da granulosa e separação pelas mucosubstâncias com conseqüente aumento da ecogenicidade produzida na imagem.

Mudanças vasculares ocorrem nos folículos equinos com a aproximação da ovulação, incluindo aumento no suporte sanguíneo, hiperemia, vasodilatação, edema e hemorragias. Tais mudanças ajudam a estabelecer um paralelo claro entre a ovulação e a reação inflamatória clássica (ESPEY, 1980). Três hipóteses foram principais e importantes para a condução deste experimento. 1- A vascularização folicular é um parâmetro que pode ser utilizado a campo para prever a ovulação de uma égua acontecendo dentro de algumas horas? 2- A baixa vascularização folicular seria a explicação para a baixa qualidade de oócitos de éguas idosas e conseqüentemente ser causa da baixa fertilidade nesses animais? 3- Existe um tratamento para indução da ovulação que resulte em maior vascularização do folículo no momento pré-ovulatório?

A primeira hipótese foi baseada no trabalho publicado por Gastal et al. (2006a) na qual os autores descreveram haver vascularização folicular em cerca de 70% no momento da indução da ovulação, aumentando progressivamente

após o tratamento com hCG e diminuindo bruscamente nas quatro horas que antecederam a ovulação. Segundo estes autores, a vascularização folicular passa de aproximadamente 85% da circunferência folicular quatro horas antes da ovulação para aproximadamente 40% na última avaliação antes da ovulação (exames com intervalo de uma hora). Pensando nesta afirmação, a diminuição da vascularização folicular seria um parâmetro bastante interessante para prever o momento da ovulação quando acompanhando a égua em momento próximos (por exemplo quando o sêmen que será utilizado para a inseminação é congelado ou de baixa fertilidade). Nestes casos, o momento no qual fosse notada a diminuição da vascularização seria o momento ideal para a inseminação da égua, devido a sua proximidade com a ovulação. Porém concluímos que este parâmetro não poderia ser utilizado em caso de avaliações com intervalos de quatro horas ou mais, pois não foi possível, neste intervalo de tempo, detectar diminuição na vascularização folicular como descrito pelos autores.

A segunda hipótese também foi respondida onde concluiu-se que a baixa vascularização folicular não é a causa da fertilidade reduzida das éguas idosas. As porcentagens de vascularização da parede folicular de éguas jovens e idosas foram aproximadas em cada momento, não havendo diferença estatística em nenhum momento de avaliação. Éguas jovens e idosas apresentaram a mesma porcentagem de vascularização na indução da ovulação, a curva foi levemente diferente ao decorrer do tempo, mas a vascularização final foi a mesma para as duas faixas de idade.

Quanto às diferenças na vascularização folicular de acordo com o agente de indução da ovulação (hipótese 3) não foi observada diferença estatística entre os tratamentos utilizados, hCG, acetato de deslorelina e a associação de ambos, não nos permitindo sugerir um tratamento de eleição para indução da ovulação baseado nessa característica. Da mesma forma, ao decorrer do tempo não houve variação expressiva na intensidade das cores, sendo a intensidade das cores uma forma inadequada de avaliar qualquer variação no fluxo sanguíneo.

O edema endometrial aumenta progressivamente durante os primeiros dias do estro, mas diminuiu com a proximidade da ovulação (HAYES et al., 1985). O



útero sob influência de estrógeno apresenta um padrão característico, facilmente detectável durante a avaliação. A diminuição no padrão de edema uterino é acelerada pelo uso de agentes indutores da ovulação conforme a égua se aproxima da ovulação (SAMPER 2008). No presente estudo, o edema uterino se comportou de acordo com o descrito na literatura. As éguas receberam o tratamento para indução da ovulação quando o edema era alto (média de  $2,43 \pm 0,37$ , escore variando de 0 a 3). Nos momentos que antecederam a ovulação a média de edema uterino caiu de 1,33 16 horas antes da ovulação para em média 0,6 no momento da ovulação. O edema uterino se mostrou um parâmetro muito fidedigno para prever a proximidade da ovulação, desde que o útero se apresente saudável, sem infecções. No caso de éguas que não ovularam o edema manteve-se alto durante todo o período de avaliações, sendo assim, o edema foi um fator bastante importante para diferenciar éguas que ovularam de éguas que não ovularam. Samper (1997) descreveu a diminuição gradativa do edema uterino de escores máximos no momento da indução da ovulação (escores de 0 a 5) para 1,3 poucas horas antes da ovulação. Já em trabalho apresentado por Gastal et al. (2006a) os autores descreveram a diminuição do edema uterino de 3,7 no momento da indução da ovulação para 3,3 36h após o tratamento com hCG (escore de 1 a 4). Ocorreu a diminuição do edema uterino, porém essa não foi tão evidente quanto a diminuição no edema uterino encontrada no presente estudo.

Samper (2008) descreveu um sistema de indução da ovulação não somente baseado no tamanho folicular, mas utilizando como parâmetro principal o edema uterino. Segundo ele o tratamento deve ser realizado quando o edema uterino apresentar seu grau máximo. A adoção desse sistema faz com que o diâmetro folicular no momento da indução da ovulação seja bastante variado entre as éguas e a resposta aos agentes é maior que 95% (SAMPER 2008). Tal conduta foi adotada na execução do presente estudo, no qual as éguas foram induzidas a ovular no momento em que seu escore de edema uterino apresentava-se alto (escore entre 2 e 3), conseqüentemente as mesmas foram tratadas com folículos apresentando 30mm ou mais.

O aumento da flutuação representa a característica de o folículo ficar mais flácido à palpação e é associada com a diminuição da tensão no interior do folículo que acontece horas antes da ovulação. Na ultrassonografia é associado com a perda do contorno esférico do folículo. No presente estudo a flutuação folicular foi classificada de 1 a 3 sendo 1 a representação de um folículo firme a palpação e 3 um folículo flácido, característica de um folículo pré-ovulatório. No momento da indução da ovulação a média da flutuação era 1,71 aumentando para 2,37 no momento que precedeu a ovulação. Os resultados são condizentes com os apresentados na literatura por McKinnon et al., 1988 que descreve perda do contorno regular em 70% dos folículos no momento pré-ovulatório.

Nove éguas não ovularam até 48 horas após a indução da ovulação sendo oito idosas e uma jovem (11 anos). As falhas nas ovulações foram sempre em ciclos nos quais a indução da ovulação foi realizada com hCG. Sabe-se que o uso repetido desta gonadotrofina implica na redução de sua eficácia (SULLIVAN et al., 1973; WILSON et al., 1990), presumidamente pela formação de anticorpos. Duchamp et al., (1987) verificaram que as éguas imunizadas contra o hCG não ovulavam em um tempo previsível após sua administração.

Em geral, éguas que não ovularam apresentaram características muito diferentes das observadas em éguas que ovularam, em todos os parâmetros avaliados. Éguas que não responderam a indução da ovulação apresentaram crescimento folicular na taxa esperada após o desvio. Éguas que ovularam apresentaram uma estagnação no crescimento folicular neste período. O diâmetro máximo alcançado por éguas que ovularam foi 1,88mm maior que no momento da indução da ovulação. Folículos de éguas que não ovularam após o tratamento continuaram crescendo a uma taxa de 2,2mm ao dia (variação de 4,42mm em 48 horas pós-tratamento). O diâmetro folicular foi uma das características mais importantes para diferenciar as duas categorias animais e uma informação clara de ser percebida a campo, já no momento da primeira avaliação (32h). Éguas que apresentam folículos que continuam crescendo normalmente após a indução da ovulação, não ovularam no intervalo esperado de 48 horas pós-tratamento.

A banda anecóica, espessura e ecogenicidade da camada de células da granulosa de éguas que não ovularam não se comportaram da forma esperada para futuras ovulações. A banda anecóica apresentava-se em 40,77% do folículo no momento da indução da ovulação e terminou em 45% da circunferência folicular. Valores diferentes dos encontrados em éguas que ovularam que partiram de 34,76% na indução para 51,28% no momento 4h anterior a ovulação, em uma curva crescente durante os momentos. A curva de aumento da ecogenicidade da camada de células da granulosa saiu de escore 2,14 aumentando e diminuindo de forma aleatória durante o tempo, porém mantendo-se em valores aproximados e terminando em 2,0 48 horas após indução da ovulação. Em éguas que ovularam, a curva iniciou em 2,02 e terminou em 2,38 no momento anterior a ovulação. A espessura da camada de células da granulosa aumentou 0,29cm 0,56cm nas éguas que não ovularam e éguas que ovularam, respectivamente.

A vascularização da parede folicular foi uma característica que apresentou grande diferença entre éguas que ovularam e éguas que não ovularam até 48 horas após a indução da ovulação. A porcentagem do folículo com sinais coloridos de éguas que não responderam a indução foi 31,43% no momento do tratamento e 35% no momento 48h, com um aumento médio de 3,57% em éguas que não ovularam. Tal variação diferiu das porcentagens encontradas em éguas que ovularam, as quais apresentaram 25,76% de vascularização no momento da indução e 50,57% no momento mais próximo da ovulação, com aumento médio de 24,81%. A vascularização folicular foi uma característica bastante distinguível e diferenciou com clareza folículos que ovularam de folículos que não ovularam no tempo esperado após o tratamento. Folículos que não ovularam não apresentaram mais que 35% da circunferência vascularizada, em nenhum momento de avaliação.

A intensidade das cores não variou consistentemente em nenhuma das duas categorias animais, éguas que ovularam e éguas que não ovularam e não colaborou para descrever as características do folículo pré-ovulatório. Escores obtidos de éguas que não ovularam no momento da indução da ovulação e no

momento 48 horas foram 2,57 e 2,75 respectivamente (variação de 0,18). Éguas que ovularam apresentaram 2,32 e 2,13 respectivamente (variação de 0,19).

O padrão de edema uterino de éguas que não ovularam também não evoluiu como o esperado. Éguas que ovularam apresentaram diminuição mais evidente entre o momento da indução e ovulação.

A flutuação do folículo pré-ovulatório também apresentou padrão diferente entre éguas que responderam e não responderam ao tratamento. Porém, diferente do esperado, éguas que não ovularam apresentaram folículos mais flutuantes do que os folículos daquelas que ovularam. Em média, éguas que não ovularam apresentaram aumento de 1,33 quando comparadas com éguas que ovularam e que apresentaram aumento médio de 0,66 no escore de flutuação folicular. Uma possível explicação desse aumento maior na flutuação folicular de éguas que não ovularam poderia ser o fato de estas terem apresentado folículos bem maiores no momento das avaliações.

*Conclusão*

---

## 7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente experimento e nas condições em que este foi realizado podemos concluir que:

A diminuição da vascularização folicular não é um parâmetro confiável para indicar a iminência da ovulação em éguas, com avaliações realizadas a cada 4 horas.

A vascularização folicular no momento pré-ovulatório não é diferente entre éguas jovens e idosas.

O padrão de vascularização folicular é similar quando do uso do hCG, do acetato de deslorelina, bem como sua associação para indução da ovulação.

Os parâmetros que melhor indicaram resposta ao tratamento 32 horas após a indução da ovulação foram: diminuição da dinâmica do crescimento folicular e do edema uterino, associado ao aumento da vascularização da parede do folículo.

Ovulação iminente pode ser determinada pela combinação dos seguintes achados: aumento da espessura e ecogenicidade da camada de células da granulosa, diminuição da turgidez com perda do contorno esférico e baixo escore de edema uterino.

Os três tratamentos utilizados para indução da ovulação, hCG, acetato de deslorelina e a associação dos dois agentes foram similares em todos os parâmetros avaliados.

Éguas idosas apresentam menor resposta ao hCG quando comparado com éguas jovens.

Éguas jovens ovulam mais rápido após tratamento com hCG quando comparadas as éguas idosas.

---

*Referências Bibliográficas*

## 8. 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. **Biol. Reprod.** v.71, p.637–642, 2004a.

ACOSTA, T.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; 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. **Biol. Reprod.** v.71, p.502–507, 2004b.

ALVARENGA, M.A.; CARMO, M.T. Biotecnologias em reprodução equina: o que há de novo para o veterinário de campo? **Brazilian Journal of Equine Medicine**, v.26, p.4-8, 2009.

BALL, B.A.; LITTLE, T.V.; WEBER, J.A.; WOODS, G.L. Survival of Day-4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. **J. Reprod. Fert.**, v. 85, p. 187-194, 1989.

BARBACINI, S.; ZAVAGLIA, G.; GULDEN, P.; MARCHI, V.; NECCHI, D. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. **Equine Veterinary Education**, v.2, p.404-410, 2000.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J. **Manual of equine reproduction**. St. Louis: Mosby, 1998. 209p.

BLANCHARD, T.L.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L. Effects of deslorelina or hCG administration on reproductive performance in first postpartum estrus mares. **Theriogenology** v.58, p.165-169, 2002.



BOLLWEIN, H.; MAIERL, J.; MAYER, R.; STOLLA, R. Transrectal color Doppler sonography of the A. uterine in cyclic mares. **Theriogenology**, v.49, p.1483-1488. 1997.

BOLLWEIN, H.; SOWADE, C.; STOLLA, R. The effect of semen extender, seminal plasma and raw semen on uterine and ovarian blood flow in mares. **Theriogenology** v.60, p.607-616. 2003.

BURATINI, J.; ROSA E SILVA, A.M.; BARROS, C.M. Q.; PAPA, F.O.; CALDAS, M.C.S.; MEIRA, C. Follicular dynamics in Mangalarga mares. **Equine Vet. J.**, supl. 25, p. 7-11, 1997.

CARNEVALE, E.M. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. **Theriogenology**, v.69, p.23–30, 2008.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, v.37, p.1101–1015, 1992.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biol. Reprod.**, (Mono 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. **J. Equine Vet. Sci.** v.8, p.428–431. 1988.

CARNEVALE, E.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Aging effects on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 31, p 287-299, 1993a.

CARNEVALE, E.M.; GRIFFIN, O.J.; GUINTER, O.J. Age-associated subfertility before entry of embryo into the uterus in mares. **Equine Vet. J.**, v.15, p.31-35, 1993b.

CARNEVALE, E.M.; ERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Follicular activity and concentrations of FSH and LH associated with senescence in mares. **Anim. Reprod. Sci.**, v.35, p.231–246, 1994.

CARNEVALE, E.M.; HERMENET, M.J.; GINTHER, O.J. Age and pasture effects on vernal transition in mares. **Theriogenology**, v. 47, p.1004-1018, 1997.

CARNEVALE, E.M.; USON, M.; BOZZOLA, J.J.; KING, S.S.; SCHIMITT, S.J.; GATES, H.D. Comparison of oocytes from young and old mares with light and electron microscopy. **Theriogenology**, v.51, p.299, 1999.

CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; PANZANI, D.; STOKES, J.E.; SQUIRES, E.L. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. **Theriogenology**, v.64, p.519-527, 2005.

DAVIS MOREL, M.C.G.; NEWCOMBE, J.R.; SWINDLEHURST, J.C. The effect of age on multiple ovulation rates, multiple pregnancy rates and embryonic vesicle diameter in the mare. **Theriogenology**, v. 63, p. 2482–2493, 2005.

DAVIS MOREL, M.C.G.; NEWCOMBE, J.R. The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: Ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. **Animal Reproduction Science** v.109, p. 189–199, 2008.

DAVIS MOREL, M.C.G.; NEWCOMBE, J.R.; HAYWARD K. Factors affecting pre-ovulatory follicle diameter in the mare: the effect of mare age, season and presence of other ovulatory follicles (multiple ovulation). **Theriogenology**, v. 74, p. 1241–1247, 2010.

DE BRUIN, J.P.; DORLAND, M.; SPEK, E.R.; POSTHUMA, G.; VAN HAAFTEN, M.; LOOMAN, C.W.N. Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries. **Biol. Reprod.**, v. 70, p.419–24, 2004.

DUCHAMP, G.; BOUR, B.; COMBARNOUS, Y.; PALMER, E. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 35, p. 221-228, 1987.

ECHTERNKAMP, S.E.; ROBERTS, A.J.; LUNSTRA, D.D.; WISE, T.; SPICER, L.J. Ovarian follicular development in cattle selected for twin ovulations and births. **J. Anim. Sci.**, v. 82, p.459–71, 2004

ESPEY, L.L. Ovulation as an Inflammatory Reaction-A Hypothesis. **Biology of Reproduction**, v.22, p.73-106, 1980.

FERREIRA J.C.; GASTAL E.L.; GINTHER O.J. Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. **Reproduction**, v. 135, p. 541-550, 2008.

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, p.1025-1038, 1998.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Interrelationships among follicles during the common-growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. **Reproduction**. v.128, p.417–422, 2004.

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. **J Equine Vet Sci**. v.26, p.67–73, 2006b.

GASTAL, E.L.; SILVA, L.A.; GASTAL, M.O., EVANS, M.J. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.186-190, 2006c.

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. **Anim. Reprod**. v.102, p314–321, 2007.

GINTHER, O.J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **J. Reprod. Fertil**. v.90, p.311–320, 1990.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects**. 2 ed. Madison: Equiservices, 1992. 642p.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Color-Doppler ultrasonography** – Book 4. Madison: Equiservices Publishing. 2007, 258p.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R. Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine estrous cycle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 99, p. 105-11, 1993.

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.; BEG, M.A. Seasonal influence on equine follicle dynamics. **Anim. Reprod.** v.1, n.1, p31-44, 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. **Biol Reprod.** v.70, p.1063–1069, 2004b.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Conversion of a viable preovulatory follicle into a hemorrhagic anovulatory follicle in mares. **Anim. Reprod.** v.3, n.1, p.29-40, 2006.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O. Spatial Relationships between Serrated Granulosa and Vascularity of the Preovulatory Follicle and Developing Corpus Luteum. **J Equine Vet Sci.** v.27, n.1, p.20-27. 2007a.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; SIDDIQUI, M.A.R., BEG, M.A. Relationships of Follicle Versus Oocyte Maturity to Ultrasound Morphology, Blood Flow, and Hormone Concentrations of the Preovulatory Follicle in Mare. **Biol. Reprod.** v.77, p.202–208, 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, 2007c.

GINTHER, O.J.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; JACOB, J.C.; BEG, M.A. Age-related dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares. **Theriogenology**, v.71, p.780–788, 2009.

HAYES, K.E.N.; PIERSON, R.A.; SCRABA, S.T.; GINTHER, O.J. Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. **Theriogenology**, v.24, n.4, p.465-477, 1985.

JACOB, J.C.F., **Dinâmica ovariana e endócrina de éguas em diferentes idades**. 2007. 41f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa – MG, 2007.

KERBAN, A.; DORÉ, M.; SIROIS J. Characterization of cellular and vascular changes in equine follicles during hCG-induced ovulation. **Journal of reproduction and fertility**, v.117, p.115-123, 1999.

KIM, S.H. Female aging and superovulation induction for IVF. **J. Obstet. Gynaecol.**, v.21, p.75–82, 1995.

KLEIN, N.A.; HARPER, A.J.; HOUMARD, B.S.; SLUSS, P.M.; SOULES, M.R. Is the short follicular phase in older women secondary to advanced or accelerated dominant follicle development? **J. Clin. Endocrinol. & Metab.**, v. 87, n.12, p.5746-5750, 2002.

KLEINBAUM, D.G.; KUPPER, L.L.; NIZAM, A.; MULLER, K.E. Applied. Regression Analysis and Multivariable Methods. Duxbury Press, Belmont, California. 2007.

KUPESIC, S.; KURJAK, A.; BJELOS, D.; VUJISIC, S. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. **Fertil. and Steril.** v. 79, n.1, p.190-197, 2003.

LEBLANC, M. Oxytocin – the new wonder drug for treatment of endometitis? **Equine Vet. Educ.**, v.6, n.1, p.39–43,1994.

LEBLANC, M. Breakdown in uterine defence mechanisms in the mare : is a delay in physical clearance the culprit? In: PROCEEDINGS OF NINETEEN BAIN-FALLOW MEMORIAL LECTURES: EQUINE REPRODUCTION, 1997. Anais... p.153-163.

LEGRO, R.S.; WONG, I.L.; PAULSON, R.J.; LOBO, R.A.; SAUER, M.V. Recipient's age does not adversely affect pregnancy outcome after oocyte donation. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.172, p. 172:96, 1995.

LOSINNO, L. **Patrones nucleares, citoplasmáticos y mitocondriales de ovócitos post-ovulatorios en yeguas de diferentes grupos etários.** 2006. Tese (doutorado) – Universidade de Buenos Aires – Arg, , 2006.

LOY, R.G. HUGHES, J.P. The effects of human chorionic gonadotrophin on ovulation, length of estrus, and fertility in the mare. **Cornell Veterinary**, v.56, p.41-50, 1966.

MALHI, P.S.; ADAMS, G.P.; SINGH, J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. **Biol. Reprod.**, v. 73, p. 45–53, 2005.

MCCUE, P.M.; FARQUHAR, V.J.; CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L. Removal of deslorelina (Ovuplant <sup>TM</sup>) implant 48h after administration results in normal interovulatory intervals in mares. **Theriogenoogy**, v.58, p.865-870, 2002.

MCCUE, P.M.; HUDSON, J.J.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. In: **50<sup>TH</sup> Annual convention of the American Association of Equine Practitioners**, Proceedings... 2004.

MCDONALD, L.E. Hormones of pituitary gland. In: BOOTH, N.H., MCDONALD, L.E. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. Ed. 6. Ames: Iowa State University Press, p.90, 1988.

MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Malvern: Lea & Febiger, 1993. 1137p.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. **Equine Reproductive Ultrasonography**. Fort Collins: Colorado State University, 1988. 60p.

MELO, C.M.; PAPA, F.O.; MEDEIROS, A.S.L.; DELLÁQUA JR, J.A.; CARMO, M.T.; ARAUJO, G.H.M.; ALVARENGA, M.A. Efeito da deslorelina e do extrato de pituitária eqüina na indução da ovulação em éguas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33 (Supl. 1), p.193, 2005.

MÜLLER, T.; GROMOLL, J.; SIMONI, M. Absence of exon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.88, p.2242-2249, 2003.

NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI JR, J.; PRICE, C. A.; CASTILHO, A.C.S.; PINTO, M.G.L.; BARROS, C.M. Expression of LH receptor mRNA Splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.680-686, 2007.

PADULA, A.M. GnRH analogue-agonists and antagonists. **Animal Reproduction Science**, v.88, p.115-126, 2005.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. Principles of Biostatistics. Duxbury Press, Belmont, California. 2000.



PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O. **Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination.** Fort Collins: Colorado State University, 1988. 132p.

PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O.; SHIDELER, R.K.; VOSS, J.L. **Management of the mare for maximum reproductive efficiency.** Fort Collins: Colorado State University, 1989. 135p.

RAMBAGS, B.P.B.; VANTOC, H.T.A.; GAIVÃO, M.M.F.; WILSHER, S.; LAZZARI, G.; GALLI, L.; ALLEN, W.R.; COLENBRANDER, B.; STOUT, T.A.E; Mitochondrial numbers in equine embryos: effects of maternal age and in vitro production. **Pferdeheilkunde**, v. 24, p118-120, 2008

SAMPER, J.C. Ultrasonographic Appearance and the Pattern of Uterine Edema to Time Ovulation in Mares. In: Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 1997. Anais... v. 43, p 189-191.

SAMPER J.C. Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. **Theriogenology**, v.70, p.445–447, 2008.

SAMPER, J.C.; JENSEN, S.; SERGEANT, J.; ESTRADA, A. Timing of induction of ovulation in mares treated with Ovulplant or Chorulon. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.22, p.320-323, 2002.

SAS Institute. 2009. SAS/STAT User's Guide. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SIDDIQUI, M.A.R.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Effect of hCG in the presence of hCG antibodies on the follicle, hormone concentrations, and the oocyte in mares. **Reprod. Dom. Anim.** v.44, n.3, p.474-479, 2009.

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, 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.

SHERMAN, B.M.; WEST, J.H.; KORENMAN, S.G. The menopausal transition: analysis of LH, FSH, estradiol, and progesterone concentrations during menstrual cycles of older women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.42, p.629–636, 1976.

SOUSA, F.A.C.; FLEURY, P.D.C.; ALONSO, M.A.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P. Aumento da disponibilidade de éguas receptoras de embrião após tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35 (Suppl.), p. 1258, 2007.

SUGINO, H.; BOUSFIELD, G.R.; MOORE JR, W.T.; WARD, D.N. Structural studies on equine glycoprotein hormones. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 8603-8609, 1987.

SULLIVAN, J.J. et al. Duration of estrous and ovulation time in non lactating mares given human chorionic gonadotrophin during three successive estrous periods. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.162, p.895-898, 1973.

TE VELDE E.R.; SCHEFFER, G.J.; DORLAND, M.; BROEKMANS, F.J.; FAUSER, B.C.J.M. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 145, p. 67–73, 1998.

THOUAS, G.A.; TROUNSON, A.O.; JONES, G.M. Effect of female age on mouse oocyte developmental competence following mitochondrial injury. **Biol. Reprod.**, v. 73, p. 366–373, 2005.

URQUIETA, B.; DURAN, M.C.; COLOMA, I.; PARRAGUEZ, V.H. hCG-Induced ovulation in Thoroughbred mares does not affect corpus luteum development and function during early pregnancy. *Reproduction of Domestic Animals*, v.44, p. 859-864, 2009.

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, p. 22-32, 1993.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L. Effect on fertility of uterine lavage performed immediately prior to insemination in mares. **J. Am. Vet Med. Assoc.**, v.222, n.8, p.1108-1110, 2003

VILLAHOZ, M.D.; SQUIRES, EL.; VOSS, J.L.; SHIDELER, R.K. Some observations on early embryonic death in mares. **Theriogenology**, v.23, p. 915-923, 1985.

VOSS, J.L. The effect of hCG on duration of oestrus, ovulation time and fertility in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.35, p.557-561, 1975.

WILSON, C.G.; DOWNIE, C.R.; HUCHES, J.P.; ROSER, J.F. Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares. **Equine Veterinary Science**, v. 10, p. 301-308, 1990.

WULFF, C.; WILSON, H.; WIEGAND, S.J.; RUDGE, J.S.; FRASER, H.M.  
Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2.  
**Endocrinology.** v.143, p.2797–2807. 2002.

---

*Artigo Científico*

## 9. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo está de acordo com as normas da revista “**Acta Scientiae Veterinariae**”

Foliculogenese em éguas: Avaliação da perfusão vascular ovariana e perifolicular por  
ultrassonografia Doppler

Renata Cristina Uliani<sup>1</sup>, Luciano Andrade Silva<sup>2</sup>, Marco Antonio Alvarenga<sup>1</sup>

**Resumo:** A ultrassonografia Doppler é uma tecnologia que vem sendo utilizada na reprodução animal. Estudos recentes buscam re-entender a fisiologia e, na tentativa de apresentar utilizações práticas, demonstraram que: durante o desvio folicular, características são observadas ao Doppler antes de serem observadas ao modo-B como alteração na velocidade do fluxo sanguíneo dois dias antes do desvio e um dia antes do aumento na área de fluxo sanguíneo da parede folicular. Segundo estes trabalhos a ovulação é caracterizada pela diminuição do fluxo sanguíneo nas últimas quatro horas que a precedem, bem como pela serração da granulosa e formação de um ápice não vascularizado. Folículos bastante vascularizados são associados com melhores taxas de prenhes e maturação oocitária que folículos pouco vascularizados. Folículos que apresentam ovulação septada apresentaram mais vascularização e serração da granulosa uma hora antes da ovulação, incluindo o ápice. Folículos hemorrágicos apresentam melhor vascularização da parede folicular no dia que antecede a ovulação. Os anovulatórios crescem a uma mesma taxa que os folículos ovulatórios, porém a porcentagem de vascularização de sua parede é muito menor, bem como a vascularização da parede do folículo que vai resultar na primeira ovulação do ano é bem menor no dia anterior a ovulação que um folículo que irá ovular no meio da estação

reprodutiva. **Conclusão:** A tecnologia Doppler tem potencial para produzir informações importantes sobre o ambiente folicular e assim ser utilizada na prática em busca de aperfeiçoar o manejo reprodutivo equino, obtendo melhor aproveitamento do material genético e aumentando o retorno financeiro.

Palavras-chave: Égua, folículo, Doppler, fluxo sanguíneo, parede folicular, ovulação.

### Sumário

1. Introdução	2
2. US Doppler no estudo do desvio e dominância folicular	3
3. US Doppler na detecção do Momento da Ovulação	4
4. Características da dinâmica folicular observadas por US Doppler na fase de transição de primavera	6
5. Referências	7

### 10. Introdução

Poucos, contudo estimulantes, são os trabalhos encontrados na literatura com uso do Doppler em reprodução equina, tendo sido este, até o momento, utilizado para estudar vascularização do folículo pré-ovulatório (V, XIII), predizer maturação oocitária (XIII), verificar qualidade folicular e oocitária (XIV) e estabelecimento de prenhes (XV) entre outros assuntos.

As características dos folículos ovarianos da égua não prenhe estão relacionadas com mudanças no seu estágio reprodutivo. Estudos envolvendo o hipotálamo, glândula pineal, e concentrações de hormônios circulantes forneceram informações importantes durante anos. Recentemente, várias adaptações estão sendo realizadas no ultrassom para

avaliar com mais ênfase os folículos como objetivos dos estudos. Estas inovações incluem: 1) Ablação dos folículos por ultrassonografia (US) transvaginal guiada, 2) Amostragem transvaginal e tratamento experimental dos folículos, e 3) Ultrassonografia Doppler para verificar as alterações na vascularização da parede folicular. Essas tecnologias avançadas têm produzido resultados que encorajam uma adequação dos conceitos atualmente conhecidos sobre dinâmica folicular e sazonalidade reprodutiva da égua (IX). Nesta revisão iremos abordar os principais achados de experimentos que se preocuparam em estudar as alterações observadas por US Doppler na dinâmica folicular de éguas.

#### 1. US Doppler no estudo do desvio e dominância folicular

O desvio folicular é precedido pela fase de crescimento comum que dura vários dias. Durante esta fase, os folículos apresentam uma taxa de crescimento similar e cada um deles tem a capacidade de se tornar dominante (IV). Neste momento, um extenso plexo vascular se desenvolve na camada da teca ao redor da membrana basal avascular e da camada da granulosa. Foi sugerido que a distribuição de gonadotropinas e nutrientes via sistema vascular mais desenvolvido apresenta relação com seleção e crescimento do folículo dominante e que o suporte vascular insuficiente contribui para a atresia folicular (XVI). Neste contexto, o desvio folicular em éguas é indicado morfológicamente não somente pela taxa de crescimento diferenciada entre os folículos dominante e subordinado em desenvolvimento, mas também por uma aparente expansão da camada anecoica vista ao ultrassom, como expressa subjetivamente, ao redor da granulosa do folículo dominante (IV). Esta mudança na ecotextura bem como o aumento dos sinais coloridos de fluxo sanguíneo vistos ao Doppler distinguem o futuro folículo dominante do maior futuro



folículo subordinado cerca de um dia antes do início do desvio do diâmetro e essa característica foi atribuída ao aumento da vascularização. Em outro estudo, Acosta et al. (II) observaram que antes mesmo de a alteração na área de fluxo sanguíneo poder ser vista no modo colorido, a análise espectral revelou que a velocidade no pico sistólico e o tempo-médio de velocidade máxima do fluxo sanguíneo começam a ser maiores no folículo dominante em média 6mm (equivalente a 2 dias) antes do desvio no diâmetro folicular. Apesar de as concentrações do fator de crescimento endotelial vascular no fluido folicular terem sido maiores no maior folículo um dia após o esperado início do desvio (X), a relação inicial de VEGF com o desvio vascular não é conhecida.

## 2. US Doppler na detecção do Momento da Ovulação

Atualmente, a eminência da ovulação em éguas é estimada na ultra-sonografia modo-B pela combinação de espessura e ecogenicidade da camada de células da granulosa, diminuição da turgidez com perda do contorno esférico do folículo, destacamento de segmentos da granulosa e manchas ecogênicas no antro, associado à diminuição do edema uterino, sendo possível prever o momento da ovulação com 24 horas de antecedência (III). Da mesma forma, uma banda anecóica vista ao modo-B progressivamente aumenta na camada da teca do folículo pré-ovulatório durante os dias que antecedem a ovulação representando o aumento fluxo sanguíneo do folículo visto no modo colorido (V).

Em estudo recente, Gastal et al. (V) observaram na ultra-sonografia por Doppler que nas últimas 4 horas que precedem a ovulação ocorre uma diminuição na porcentagem da circunferência do folículo com apresentação colorida juntamente com uma diminuição na intensidade das cores. As duas superfícies da granulosa (voltada para o antro e para a teca interna) se tornam irregulares durante as últimas poucas horas que antecedem a ovulação

(VI). Este fenômeno é chamado de serração da granulosa e é visto mais proeminente na base do folículo oposta ao ápice (futuro local de ovulação). Neste estudo os autores notaram também a formação de uma área apical não vascularizada reconhecida pela alteração no formato esférico do folículo poucas horas antes da ovulação, indicando o futuro ponto de ruptura. Porém, em estudo ainda em andamento em nosso laboratório (Uliani e colaboradores, dados não publicados) não foi observada diminuição na quantidade de vascularização no momento imediatamente anterior a ovulação.

Em éguas, aumento da corrente sanguínea e aumento no diâmetro do folículo pré-ovulatório entre momento da indução da ovulação e 30 horas após injeção de HCG foi associado com melhores taxas de prenhez (XV). Além disso, sinais mais intensos de cor intraovarianos indicaram decréscimo nos índices de resistência (aumento da perfusão vascular) e aumento na velocidade do sangue em éguas que ficaram gestantes (XV). Contudo o próprio autor ressalta a necessidade do uso de maior número de animais para confirmar estes achados. Ginther et al., (XIII) realizam estudo no qual aspiraram folículos 30h após tratamento com hCG e avaliaram a maturação oocitária. Eles observaram que o fluxo sanguíneo foi melhor para o grupo de oócito não recuperado que oócito recuperado e melhor para o grupo de oócito maduro que oócito imaturo. A análise espectral não revelou diferenças entre os grupos. Esses resultados são inconsistentes com estudos anteriores e por isso foram considerados inconclusivos. Em outro estudo, Siddiqui et al. (XIV) avaliaram o fluxo sanguíneo da parede folicular após tratamento com hCG de éguas que apresentaram anticorpos contra hCG e éguas que não apresentaram anticorpos. Os folículos foram aspirados 30h após e não apresentaram diferenças entre os grupos quanto a taxa de recuperação oocitária, porém apresentaram significativamente menos fluxo sanguíneo na

parede folicular de éguas anticorpos-negativo que para éguas anticorpos-positivo. A análise espectral não apresentou diferenças entre os grupos.

Distúrbios na ovulação podem ser apresentados na forma de evacuações septadas com descarga prolongada e não ovulação com a posterior formação de um folículo anovulatório hemorrágico (FAH). Evacuações septadas são associadas com melhores serração e vascularização da parede folicular uma hora antes da ovulação quando comparada a evacuação normal, incluindo também a área apical (XII). Serração e vascularização em éguas com evacuação normal não foram encontrados no pólo apical. Se o oócito foi incluso na descarga prolongada é desconhecido (XII). Estudando os FAHs, Ginter et al. (XI) notaram que o diâmetro folicular não foi diferente entre os folículos que ovularam e os que formaram FAH no dia anterior a ovulação. Os resultados também indicaram que concentrações elevadas de estradiol sistêmico poucos dias antes da ovulação esperada e melhor vascularização do folículo no dia anterior da ovulação estão envolvidos na conversão de um folículo pré-ovulatório viável em um FAH, porém os resultados ainda não são consistentes, pois as avaliações foram realizadas com intervalos longos de 24h.

### 3. Características da dinâmica folicular observadas por US Doppler na fase de transição de primavera

A transição entre as estações ovulatória e anovulatória ocorre na primavera e é frequentemente caracterizada pela formação de um ou vários folículos dominantes anovulatórios até um folículo dominante ovulatório terminar a estação anovulatória (I). As características do desvio folicular são similares entre as fases. Durante o crescimento de 20 para 30 mm, os folículos crescem a uma mesma taxa, sendo o tamanho do folículo incapaz de identificar sua saúde. A tecnologia color-doppler distinguiu entre futuros folículos

dominantes ovulatórios e anovulatórios com acurácia razoável. No dia em que o folículo atingiu 35mm, a área vascularizada foi de 0,48 a 0,81cm<sup>2</sup> no grupo ovulatório e de 0,12 a 0,28 cm<sup>2</sup> no grupo anovulatório (I).

O diâmetro do folículo pré ovulatório no dia anterior a ovulação é aproximadamente 5mm maior antes da primeira que antes da segunda ovulação do ano (VIII). Porém, em um estudo utilizando ultrassonografia doppler, Gastal et al. (VII) observaram uma taxa de aumento da vascularização muito reduzida precedendo a primeira ovulação (dia 0) do ano, sendo a área vascularizada (cm<sup>2</sup>) da parede folicular similar entre os grupos pré-ovulatórios no dia -6, mas muito menor no dia -1 precedendo a primeira ovulação do ano, podendo esta característica ser utilizada para identificar a saúde do folículo e assim evitar perdas econômicas.

## Conclusão

A tecnologia Doppler é uma nova ferramenta para avaliação das características foliculares e melhor entendimento de alterações fisiológicas do ciclo estral. Contudo uma maior gama de estudos é necessária em busca das reais aplicações desta técnica visando seu uso a campo, para incremento de fertilidade e melhoria da eficiência de biotecnologias como a Inseminação Artificial.

Mare's Folliculogenesis: Assessment of ovarian and perifollicular vascular perfusion by  
Doppler ultrasound

Renata Cristina Uliani<sup>1</sup>, Luciano Andrade Silva<sup>2</sup>, Marco Antonio Alvarenga<sup>1</sup>

**Abstract:** Doppler ultrasound is a technique that has been used in animal breeding. Recent studies are looking for re-understand the pathophysiology and on the way to give practical uses showed that: during follicular deviation, characteristics are observed by Doppler before being observed under B-mode like changes in velocity of blood flow two days before deviation and one day before the increase in blood flow area of the follicular wall. According to these works, ovulation is characterized by decreased blood flow in the last four hours prior to ovulation, as well as serration of the granulosa and formation of an apex not vascularized. Very vascularized follicles are associated with higher pregnancy rates and oocyte maturation that less vascularized follicles. Follicles that will result in septate ovulation showed more vascularization and serration of the granulosa one hour prior to ovulation, including the apex. Hemorrhagic follicles have better vascularization of the follicular wall on the day preceding ovulation. The anovulatory follicles grows at the same rate as ovulatory follicles, but the percentage of vascularization of its wall is much smaller, and the wall vascularization of the follicle that results in the first ovulation of the year is much smaller on the day before ovulation than the wall of one follicle that will ovulate on the middle of the breeding season.

**Conclusion:** Doppler technology has the potential to yield important information about the follicular environment and thus be used in practice in the search of the perfect equine reproductive management and getting better use of genetic material and better economic return.

Key-words: Mare, follicle, Doppler, blood flow, follicular wall, ovulation.

### Sumário

1. Introduction	2
2. Doppler U.S. to study deviation and follicular dominance	3
3. Doppler US to detect the time of ovulation	4
4. Characteristics of follicular dynamics observed by Doppler U.S. on the spring transition	6
5. References	7

### 1. Introduction

Few, however exciting, are studies in the literature with use of Doppler in equine reproduction, this has been used for studying vascularization of the preovulatory follicle (V, XIII), predict oocyte maturation (XIII), follicular and oocyte quality check (XIV) and establishment of a pregnancy (XV) and more.

The characteristics of the ovarian antral follicles of non pregnant mares have relation with changing in their reproductive stages. Studies involving the hypothalamus, pineal gland, and concentrations of circulating hormones have been given productive consideration for many years. Recently, several productive ultrasound adaptations have been made to better consider the follicles as targets or end points in seasonality studies. These innovations include: 1) transvaginal ultrasound-guided ablation of follicles appropriate to a given hypothesis, 2) transvaginal sampling and experimental treatment of targeted follicles, and 3) color Doppler ultrasound for assessing the changing vascularity of the follicle wall. These advances in technology have produced results that encourage a review of the current status of follicle dynamics and seasonality (IX).

## 2. Doppler U.S. to study deviation and follicular dominance

Deviation is preceded by a common growth phase of several days. During this phase, the follicles grow at an approximately similar rate and each follicle has the capacity for future dominance (IV). During follicle growth, an extensive vascular plexus develops in the thecal layer surrounding the avascular basement membrane and granulosa layer. It has been suggested that the preferential delivery of gonadotropins and nutrients via a more highly developed vascular system in individual follicles plays a role in the selection and growth of the dominant follicle and that insufficient vascular support contributes to follicle atresia (XVI). In this regard deviation in mares is indicated morphologically not only by differential growth rate between the developing dominant and subordinate follicles, but also by an apparent expansion of the anechoic ultrasonic layer, as expressed subjectively, surrounding the granulosa of the dominant follicle (IV). This echotexture change distinguished the future dominant follicle from the future largest subordinate follicle about one day earlier than the beginning of diameter deviation and was attributed to increased vascularization. In another study, Acosta et al. (II) observed that even before the change in blood flow area can be viewed in color mode, the spectral analysis showed that the peak systolic velocity and time-average maximum velocity of blood flow begins to be higher in the dominant follicle in 6mm average (equivalent to 2 days) before deviation in follicle diameter. Although the concentrations of vascular endothelial growth factor in follicular fluid were higher in the largest follicle one day after the expected beginning of deviation (X), the original ratio of VEGF with the deviation is not known.

## 3. Doppler US to detect the time of ovulation

Currently, the imminence of ovulation in mares is estimated on B-mode ultrasound by the combination of thickness and echogenicity of the granulosa cell layer, decreased turgidity, loss of spherical shape of the follicle, granulosa detaching and echogenic spots in antrum, associated with decreased uterine edema, and can predict ovulation 24 hours before (III). Likewise, an anechoic band seen on B-mode gradually increases in the theca layer during the days preceding ovulation representing the blood flow of the follicle (V).

In a recent study, Gastal et al. (V) observed in ultrasound Doppler that in the last 4 hours before ovulation occurs a decrease in the percentage of follicle circumference with color display and a decrease in the intensity of colors. The two surfaces of the granulosa (facing the antrum and the theca interna) become irregular during the last few hours prior to ovulation (VI). This phenomenon has been termed serration of the granulosa. Serration seemed most prominent at the base of the follicle opposite to the apex (future ovulation site). In this study, the authors noted also a formation of a not vascularized apical area recognized by a alteration on the formerly spherical follicle a few hours before ovulation, indicating the future rupture point. However, in ongoing study in our laboratory (Uliani et al, unpublished data) there was no decrease in the amount of vascularization at the time immediately preceding ovulation.

In mares, increased blood flow and increase in diameter of the preovulatory follicle between the time of ovulation induction and 30 hours after HCG injection was associated with higher rates of pregnancy (XV). Moreover, signs of more intense intraovarians signals of color indicated a decrease in rates of resistance (increased vascular perfusion) and increase in blood velocity in mares that became pregnant (XV). However the author showed the necessity to use more number of animals to confirm these findings. Ginther et al. (XIII) conducted a study in which follicles were aspirated 30 h after treatment with hCG



and oocyte maturation rate was assessed. They observed that blood flow was better for the group of oocytes not recovered than for recovered oocytes and better for the group of mature oocyte than for immature oocyte. Spectral analysis revealed no differences between groups. These results are inconsistent with previous studies and therefore were considered inconclusive. In another study, Siddiqui et al. (XIV) evaluated blood flow in the follicular wall after treatment with hCG of mares whom had antibodies against hCG and mares that did not have antibodies. Follicles were aspirated 30 hours after and were not differences between groups regarding the recovery rate, but showed significantly less blood flow in the follicular wall of mares antibody-negative than antibody-positive mares. Spectral analysis showed no differences between groups.

Disturbances in ovulation may be submitted in the form of septed evacuations with prolonged discharge and no ovulation with the subsequent formation of a hemorrhagic anovulatory follicle (HAF). Septated evacuations are associated with better serration and vascularization of the follicular wall one hour prior to ovulation when compared to normal evacuation, also including the apical area (XII). Serration and vascularization in mares with normal ovulation were not found in the apical pole. If the oocyte was included in the extended discharge is unknown (XII). Studying the HAFs, Ginter et al. (XI) noted that follicular diameter was not different on the day before ovulation between the follicles that ovulated and those that formed one HAF. The results also indicated that high concentrations of systemic estradiol few days before the expected ovulation and better vascularization of the follicle on the day before ovulation are involved in the conversion of a viable preovulatory follicle into a HAF, but results are inconsistent because assessments were conducted with long intervals of 24 hours.

#### 4. Characteristics of follicular dynamics observed by Doppler U.S. in the spring transition

The transition between the anovulatory and ovulatory seasons occurs in the spring and often is characterized by the formation of one or several anovulatory dominant follicles until a dominant ovulatory follicle terminates the anovulatory season (I). The characteristics of the deviation are similar between both the phases. During the growth of follicles from 20 to 30 mm, the anovulatory follicles expanded at the same rate as the ovulatory follicles, being size of the dominant follicles unable to identify their health. The color Doppler ultrasound technology distinguished between future anovulatory and ovulatory dominant follicles with reasonable accuracy. On the day that the follicle reached 35mm, vascularized area was 0.48 to 0.81 cm<sup>2</sup> in the ovulatory group and from 0.12 to 0.28 cm<sup>2</sup> in anovulatory group (I).

The diameter of the preovulatory follicle on the day before ovulation is about 5mm greater before the first than before the second ovulation of the year (VIII). However, in one study, Gastal et al. (VII) observed a much reduced rate of increase in vascularity preceding the first ovulation (day 0) of the year, The vascularized area (cm<sup>2</sup>) of the follicle wall was similar between the preovulatory groups on Day -6, but the area was much smaller on Day -1 preceding the first ovulation, this characteristic may be used to identify the health of the follicle and thus prevent economic losses.

#### Conclusion

Doppler technology is a new tool for assessment of follicular characteristics and better understand the physiological changes of the estrous cycle. However a wider range of studies is needed looking for the real applications of this technique aiming its use by

veterinarians to increase fertility and improve the efficiency of biotechnologies such as artificial insemination.

## 5. References

- (I) **Acosta T.J., Beg M.A., Ginther O.J. 2004a.** Aberrant Blood Flow Area and Plasma Gonadotropin Concentrations During the Development of Dominant-Sized Transitional Anovulatory Follicles in Mares. *Biol. Reprod.* 71:637–642.
- (II) **Acosta T.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Beg M.A., Ginther O.J. 2004b.** Differential Blood Flow Changes Between the Future Dominant and Subordinate Follicles Precede Diameter Changes During Follicle Selection in Mares. *Biol. Reprod.* 71:502–507.
- (III) **Carnevale E.M., McKinnon A.O., Squires E.L., Voss J.L. 1988.** Ultrasonographic characteristics of the preovulatory follicle preceding and during ovulation in mares. *J. Equine Vet. Sci.* 8:428–431.
- (IV) **Gastal E.L., Gastal M.O., Beg M.A., Ginther O.J. 2004.** Interrelationships among follicles during the common-growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. *Reproduction.* 128:417–422.
- (V) **Gastal E.L., Gastal M.O., Ginther O.J. 2006a.** 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.* 131:699–709.
- (VI) **Gastal E.L., Gastal M.O., Ginther O.J. 2006b.** Serrated granulosa and other discrete ultrasound indicators of impending ovulation in mares. *J Equine Vet Sci.* 26:67–73.
- (VII) **Gastal E.L., Gastal M.O., Donadeu F.X., Acosta T.J., Beg M.A., Ginther O.J. 2007.** Temporal relationships among LH, estradiol, and follicle vascularization preceding

the first compared with later ovulations during the year in mares. *Anim. Reprod.* 102:314–321.

**(VIII) Ginther, O.J. 1990.** Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. *J. Reprod. Fertil.* 90:311–320.

**(IX) Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Beg M.A. 2004a.** Seasonal influence on equine follicle dynamics. *Anim. Reprod.* 1(1):31-44.

**(X) Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Checura, C.M., Beg M.A. 2004b.** Dose response study of intrafollicular injection of insulin-like growth factor-1 on follicular-fluid factors and follicle dominance in mares. *Biol Reprod.* 70:1063–1069.

**(XI) Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Beg M.A. 2006.** Conversion of a viable preovulatory follicle into a hemorrhagic anovulatory follicle in mares. *Anim. Reprod.* 3 (1):29-40.

**(XII) Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O. 2007a.** Spatial Relationships between Serrated Granulosa and Vascularity of the Preovulatory Follicle and Developing Corpus Luteum. *J Equine Vet Sci.* 27(1):20-27.

**(XIII) Ginther O.J., Gastal E.L., Gastal M.O., Siddiqui, M.A.R., Beg M.A. 2007b.** Relationships of Follicle Versus Oocyte Maturity to Ultrasound Morphology, Blood Flow, and Hormone Concentrations of the Preovulatory Follicle in Mare. *Biol. Reprod.* 77:202–208.

**(XIV) Siddiqui, M.A.R., Gastal E.L., Gastal M.O., Beg M.A., Ginther O.J. 2009.** Effect of HCG in the presence of HCG antibodies on the follicle, hormone concentrations, and the oocyte in mares. *Reprod. Dom. Anim.* 44(3):474-479.

**(XV) Silva, L.A., Gastal E.L., Gastal M.O., Beg M.A, Ginther O.J. 2006.** Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. *Anim. Reprod.* 3:339-346.

**(XVI) Wulff C., Wilson H., Wiegand S.J., Rudge J.S., Fraser H.M. 2002.** Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2. *Endocrinology.* 143:2797–2807.

**Anexo 1 – Tabela 2** – Diâmetro folicular avaliado através da ultrassonografia modo-B de cada animal, em todos os momentos dos três tratamentos realizados.

éguas	Diâmetro folicular																
	Tratamento 1					Tratamento 2					Tratamento 3						
	ind	-16	-12	-8	-4	ind	-16	-12	-8	-4	ind	-16	-12	-8	-4		
1	34.4			36.8	36.2	30.8		34.35	35.55	35.65				31.7		21.55	36.95
2	31.5			35.75	34.25	32		33	33.3	32.8				32.7		34.35	35.9
3	35.4			36.4	36.25	29.05			33.5	32.75				32.75			31.7
4	35.35	33.75	34.75	35	33.1	31.3			31.4	31.1				28.45		28.4	29
5	28.75				33.1	33.2			32.15	28.45				33.6			33.75
6	32.35				33.6	36.65		37	36.45	39.4				33.1			34.15
7	38.05	37	37.65	39.35	32.5	32.85	38.55	37.65	37.8	37.45				35.25		37.8	39
8	34.2	37.15	40.6	39.45	36.6	32.3	36.3	35.3	34.7	33.25				33.75		35.2	32.7
9	31.2			27.1	32.25	29.9		32	26.75	31.45				33.8		35.05	34.65
10	35.09				34.75	31.05	30.8	33	34.6	32.45				36.4		36.9	37.55
11						29.15	33.35	32.65	33.1	30.45			30.5	27.5		28.7	27.8
12						32.45			30.4	30.25				31.7		27.2	29.15
13						39.7			43.4	43				31.05		34.15	31.35
14						32			35.3	38.4				31.95	33.6	33.35	32.35
15						27.75		29	26.5	24.2				38.75			37.9
16						32.1				34.25				35.75		35.4	34.3
17						32.2			34.15	34.05				32.05		35.05	30.6
18	41.1				38.3	37.15			41.5	37.5				35.05			40.1
19						30.8			36	30.15				37.75		40.45	36.95
20						32.1			36.85	31.4				32.85			34
21	32.95				34.3	33.3			35.35	35.3				32.05		35.75	31.8
22	31.7				28.8	32.05			32.6	31.45				28.55		27.35	28.6

**Anexo 2 – Tabela 3** - Diâmetro folicular avaliado através da ultrassonografia modo-B de éguas que não ovularam até 48 horas após o tratamento. Valores de cada animal, em todos os momentos dos três tratamentos realizados.

Diâmetro folicular - Éguas que não ovularam								
Tratamento 1								
égua	ind	32	36	40	44	48		
11	30	32.5	35	32.1	33.6	33		
12	32	37.15	37.2	36	34.35	35		
13	35	40	42.15	41.75	40.1			
14	31	39.65	35.65	38.15	40.75	41.5		
15	30	29.65	27	27.85	32.7			
16	33	32.9	35.15	31.45	29			
17	34	35.8	37.8	38.15	40.6			
19	33	37.3	37.15	37.05	41			
20	35	36.55	35.4	36.8	39.6	38.4		

**Anexo 3 – Tabela 4** – Valores do edema uterino encontrados através da ultrassonografia modo-B de cada animal, em todos os momentos dos três tratamentos realizados.

		Variação do edema uterino																	
		Tratamento 1					Tratamento 2					Tratamento 3							
	ind	-16	-12	-8	-4	0	ind	-16	-12	-8	-4	0	ind	-16	-12	-8	-4	0	
1	2			2	2		2		0	0	0		3			0	0	0	
2	3			0.5	0								3			0.5			
3	3						2			1	1.5	2	2					0	0
4	2	1.5	1	1	0.5	0.5	2.5			0	0		3			0	0	0	
5	3				1	1	2		0	1			2.5					0	0
6	3				1	1.5	3		0		0		3				0.5		
7	3	0	0	0	0		3	0	0	0			3			0		0	
8	3	2.5	2.5	2.5	1.5	2	3	0	0	0	0		3			0	0	0	
9	3			1.5	0	0	3			0.5			2			1	0		
10	3				0	0	2	2	3	2.5	3	1	3			0.5	0		
11							2	2	1.5	1.5	1		3		0	0	0	0	
12							3			0.5	0.5	0	2.5			0.5	0	0	
13							3			1	1	1	3			1.5	1	0	
14							2.5			1	0.5		3		0	1	2		
15							3		2	3	3	3	2						
16							3				1	0	3			1.5	0	1	
17							2.5			1	1	1	3			2	2	1.5	
18	2				1		2			0.5	1.5		2				1	1	
19							3			1.5		0.5	3			3	2		
20							2.5			3.5	0	0.5	3				0		
21	3			1	1	0	3			2			3			0.5			
22	3			0	0		3			1.5			3			0.5	1	0.5	
23	3			2	1.5	1	3			0.5	0	0	3				2		



**Anexo 4 –Tabela 5** – Valores de edema uterino encontrados através da ultrassonografia modo-B de éguas que não ovularam até 48 horas após o tratamento. Valores de cada animal, em todos os momentos dos três tratamentos realizados.

Variação do edema uterino - Éguas que não ovularam									
Tratamento 1									
égua	ind	32	36	40	44	48			
11	2	0	0.5	0.5	0	0			
12	2	3	1	1.5	1	0			
13	3	3	2.5	3	2	2			
14	3	0	1.5	3	3	3			
15	3	3	3	2	2				
16	3	2	1	0.5					
17	2	2	3	3					
18	2	1							
19	2.5	2	2.5	3	3	2.5			
20	2.5	2			0.5	0.5			

